ETUDES DE VIROLOGIE APPLIQUEE

N°5_ Mars 1964

Ministère de l'Agriculture

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

ETUDES DE VIROLOGIE APPLIQUEE

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONO
SERVICE DE
27 AVR. 1964
DOCUMENT
VERSAILLES

Station Centrale de Pathologie Végétale

Service de Virologie - VERSAILLES.

n°5 - Mars 1964

S O M M A I R E

- Le Rétablissement et la Localisation des Symptômes chez la Flavescence ..... A.CAUDWELL 1-4

- Bois Noir et flavescence dorée..... A.CAUDWELL et G.DETIENNE 5-6

- Isolement d'un nouveau virus de la Fève J.C.DEVERGNE et M.SMITH 7-11

- Etude au Microscope électronique d'un virus parasphérique de la fève..... J.C.DEVERGNE 13-21

- Présence d'un virus latent dans plusieurs variétés française et nord-Africaine d'Artichaut E.POCHARD - S.MEHANI - J.MARROU 23-29

- Essai de production de graines de laitue sans virus J.MARROU - M.TRAPATEAU 31-46

- Quelques essais et observations concernant l'épidémiologie de maladie à virus du type Jaunisse sur tomate. Recherche de vecteurs possibles M.T.COUSIN (Mme) - J.P.MOREAU - J.ROUGIER 47-54

- Effects of an Iron chelator during the extraction of Ribonuclic Acid..... Susan H.SCHENCK 55-57

- Confirmation de la transmission du virus de la dégénérescence infectieuse par XIPHINEMA INDEX (Thorne et ALLEN) et de l'activité parasitaire de ce nématode sur la vigne. A.VUITTENEZ et R.LEGIN 59-68

- Souches de virus à haute agressivité isolées de vigne atteintes de dégénérescence infectieuse. A.VUITTENEZ - M.C.MUNCK (Mlle) et J.KUSZALA 69-78

- Influence théorique de certaine méthode de travail sur la fréquence des viroses dans les pépinières fruitières ..... G.MORVAN 79-94

- La rosette du Luizet ..... G.MORVAN et C.CASTELAIN 95-97

- Purification du virus de la Mosaïque de la tulipe J.ALBOUY (Mme) 99-100

(Voir suite au dos) .../...

- Etude d'une maladie à virus du Concombre ..... D.SPIRE 101-103

- Extraction de l'acide nucléique infectieux du virus Y de la Pomme de terre D.SPIRE et J.BERTRANDY 105-107

- Recherches concernant l'extraction et la purification des virus X - Y et S de la pomme de terre.....D.SPIRE- M.C.GRISON(Mme) et J.BERTRANDY 109

- Observation de quelques maladies à virus susceptibles d'être transmises par cicadelles en France .....M.T.COUSIN(Mme) 113-119

- Inoculation mécanique du virus I du Concombre J.MARROU et C.FAUVEL 121-129

- Libération d'acide ribonucléique viral infectieux au cours du broyage de feuilles de Haricot infectées par le virus de la "Southern Bean Mosaïc" ..... B.DIGAT 131-134

- L'utilisation des hôtes différentiels dans l'isolement et l'identification des virus des Légumineuses ..... J.C.DEVERGNE 135-198

- La replication des virus à acide ribonucléique P.CORNUET et S.ASTIER-MANIFACIER 199-208

LE RETABLISSEMENT ET LA LOCALISATION DES SYMPTOMES CHEZ LA FLAVESCENCE DOREE

A. CAUDWELL
Station de Pathologie Végétale du Sud-Ouest (INRA) Pont-de-la-Maye (Gironde)

Le comportement de la Flavescence dorée de la vigne est remarquable à deux titres parmi les viroses des végétaux. En premier lieu, les ceps malades se rétablissent après la manifestation des symptômes. En second lieu, ils ne sont souvent atteints que sur certains de leurs sarments. Ces deux faits sont déjà connus depuis plusieurs années (CAUDWELL 1956, 1957, 1961). Ils ont pu être analysés et paraissent susceptibles de recevoir une explication.

RAPPEL DE QUELQUES FAITS

Le rétablissement

Le rétablissement des ceps malades est complet et définitif en l'absence de réinoculations par les vecteurs. Les bois rétablis ne sont plus infectieux, les rechutes sont dues à des réinoculations. Le virus disparaît donc apparemment des plantes malades et il semble possible d'envisager la lutte contre cette maladie par la destruction des vecteurs même pour les plantes qui sont déjà atteintes (CAUDWELL 1961).

La localisation des symptômes

Les symptômes de la Flavescence dorée sont le plus souvent localisés à certains rameaux du cep. Nous avons pu montrer que cette particularité intervenait essentiellement dans deux cas, lorsque le cep est court-noué (CAUDWELL et POITOU 1960), lorsqu'il a déjà été atteint précédemment par la Flavescence dorée (CAUDWELL 1957, 1961). Les symptômes restent alors circonscrits à quelques sarments généralement groupés et atteints sur toute leur longueur. Nous pouvons dire que l'expansion de la Flavescence dorée sur la vigne paraît freinée par une réaction de défense lorsque le végétal a été attaqué antérieurement par un virus, celui du court-noué ou celui de la Flavescence dorée.

LES REACTIONS DE DEFENSE

La réaction de défense due à la Flavescence dorée.

Un certain nombre de caractéristiques de la réaction de défense due à la Flavescence dorée peuvent être connues. En premier lieu, elle est proportionnelle aux attaques de la maladie qui lui donnent naissance. De nombreux faits nous le prouvent. Les rechutes sont rares dans l'année qui suit les attaques les plus graves de la maladie. C'est surtout le cas après la première infection (crise) des très jeunes vignes qui sont les plus sensibles. Après des attaques plus bénignes, les rechutes se manifestent normalement par des symptômes "localisés". Si l'on bouture les bois sans symptômes et les bois avec symptômes d'un même cep malade, c'est

sur les pousses de ces derniers que se manifeste le plus rarement le syndrome de la Flavescence dorée.

Une seconde caractéristique de la réaction de défense que nous étudions est qu'elle s'estompe avec le temps. La grande rareté des rechutes après les fortes attaques de la maladie ne dure que quelques années. De même, la "localisation" des symptômes ne se manifeste que dans le cas où le cep a subi une attaque de Flavescence dorée depuis moins de trois ans. Au-delà, les symptômes redeviennent systémiques. La crise n'est donc pas la caractéristique d'une première infection. Elle peut se reproduire si le cep n'a pas subi de réinoculations, c'est-à-dire de rappels de la réaction de défense, depuis plus de trois ans. Nous avons déjà signalé aussi que les symptômes ont d'autant plus de chances de se manifester sur des boutures que les ceps mères dont elles proviennent ont subi leur crise depuis plus longtemps.

Nous pouvons dire enfin que cette réaction de défense continue à se manifester après la disparition de l'infectiosité des bois, qui paraît intervenir au moment même du rétablissement. Trois ans après celui-ci, la réaction de défense est encore bien décelable, et elle ne semble donc pas liée à la présence du virus. Après la disparition de l'agent infectieux cependant, elle s'estompe lentement.

La réaction de défense due au Court-noué

L'interaction de deux viroses non apparentées peut prendre diverses formes. Il y a le plus souvent synergie avec production d'un nouveau type de symptôme plus grave. Beaucoup plus rarement, il y a antagonisme avec réduction de l'intensité de l'attaque. Il est curieux de constater que l'interaction du Court-noué et de la Flavescence dorée se manifeste par une réaction antagoniste en tous points comparable à la réaction de défense due à la Flavescence dorée.

Le mode d'action de ces deux facteurs est identique et se manifeste par une localisation des symptômes de la Flavescence dorée. La réaction de la plante à la seconde inoculation de cette maladie sert en quelque sorte de signe de la présence antérieure de l'un des deux virus du Court-noué ou de la Flavescence dorée dans le végétal.

Ces deux facteurs ne s'additionnent pas. Nous pouvons montrer en effet que les rechutes de Flavescence dorée ne sont pas moins graves sur les ceps court-noués que sur ceux qui ne le sont pas. De même, l'influence de l'ancienneté de la crise d'un cep sur la manifestation des symptômes chez les boutures qui en proviennent n'est apparente que sur les descendances non court-nouées.

Enfin la permanence de ces deux facteurs est liée à celle du virus qui la provoque. La réaction de défense due à la Flavescence dorée s'estompe en quelques années après la disparition apparente de l'agent infectieux. Celle qui est due au Court-noué est permanente comme le virus qui lui donne naissance.

Nous ne pouvons pas ne pas être frappé par la parfaite similitude des réactions de défense due soit au Court-noué soit à la Flavescence dorée. Il semble que nous soyons en présence d'une seule réaction de défense non spécifique en ce sens qu'elle peut être provoquée par un virus et agir sur un autre.

Conclusion

Nous venons de voir qu'une attaque d'un cep de vigne par la Flavescence dorée peut être contrariée par une réaction de défense du végétal. Cette réaction de défense prend naissance à l'occasion d'une attaque antérieure du cep par un virus. Elle est proportionnelle à cette attaque, et s'estompe peu à peu si l'agent infectieux vient à disparaître. Elle persiste cependant au-delà de la disparition apparente du virus. Il semble en outre que cette réaction de défense ne soit pas spécifique.

INTERPRETATION DU RETABLISSEMENT ET DE LA LOCALISATION DES SYMPTOMES

Les interprétations des faits de rétablissement chez les viroses des végétaux ont fait couler beaucoup d'encre. Il peut être utile d'exprimer ce que les considérations que nous venons de faire peuvent suggérer pour l'interprétation du comportement de la Flavescence dorée.

Le rétablissement

La réaction de défense due à la Flavescence dorée naît avec les manifestations de la maladie, elle semble proportionnelle à la gravité des symptômes et s'estompe avec le temps. Il semble évident dans ces conditions qu'elle doit être particulièrement forte au moment même de son apparition et qu'elle fasse barrage non seulement aux attaques ultérieures de la maladie, mais surtout à celle qui lui donne naissance. La réaction de défense paraît donc rendre compte des faits de rétablissement.

La localisation des symptômes

Si une infection survient dans des tissus sains, elle s'y étend de façon systémique. La réaction de défense suit donc avec retard la synthèse du virus. Après le rétablissement, elle subsiste quelques années et si une nouvelle infection survient, nous savons que celle-ci peut s'établir et même s'étendre quelque peu, mais elle reste localisée. Il apparaît donc que la protection nouvellement produite s'ajoute à celle qui reste de la précédente infection. Il faut admettre que la réaction de défense nouvellement produite se propage alors plus rapidement que le virus. La progression de ce dernier serait donc retardée dans un cep rétabli par les restes de protection provenant de l'infection précédente.

Le caractère systémique de la réaction de défense peut être confirmé par d'autre faits. Signalons par exemple qu'une rechute succédant à une rechute conduit toujours à des symptômes localisés, que les

symptômes se manifestent ou non sur les mêmes parties du cep.

DISCUSSION

On peut se demander si l'explication suggérée par les faits connus chez la Flavescence dorée rendrait compte des autres cas de rétablissement ou de localisation des symptômes chez les viroses végétales.

La possibilité d'une migration de la réaction de défense en retard ou en avance sur la multiplication de l'agent infectieux expliquerait bien les différences observées dans le comportement du Ring-spot du tabac (immunité non transmissible par la greffe) et du Curly-top de la betterave (immunité transmissible par la greffe).

L'explication de la localisation des symptômes par une attaque antérieure d'un virus serait à vérifier dans d'autres cas notamment chez les arbres fruitiers. Nous pensons qu'il s'agit là de la première interprétation donnée à ce type de comportement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CAUDWELL A., 1956. Recherches et observations sur la maladie du Baco 22 A en 1955 et 1956. Le Réveil landais, n° 107, 2ème quinzaine d'octobre 2-3.

CAUDWELL A., 1957. Deux années d'études sur la Flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. Ann. amél. Pl. 4, 359-393

CAUDWELL A., POITOU Nicole 1960. Interaction entre Court-noué et Flavescence dorée. C.R. Acad. agric. Fr. 16, 958-963

CAUDWELL A., 1961. Les phénomènes de rétablissement chez la Flavescence dorée de la vigne. Ann. Epiph., 12, 3, 347-354

JR/11.2.64

BOIS NOIR ET FLAVESCENCE DOREE

A. CAUDWELL ET G. DETIENNE
Station de Pathologie Végétale
Centre de Recherches agronomiques du Sud-Ouest, Pont-de-la-Maye (Gironde)

Il a été signalé (BRANAS, 1956 ; CAUDWELL 1961 b) qu'il existait sur le Chardonnay en Bourgogne et dans le Jura une maladie de la vigne dite Bois noir. Elle est très semblable par ses symptômes à la Flavescence dorée, virose qui sévit sur le Baco 22 A dans le Sud-Ouest de la France.

Nous avons fait en 1962 un certain nombre d'essais de transmission par la greffe du Bois noir au Baco 22 A et de la Flavescence dorée au Chardonnay. Il est apparu que la transmission se fait bien et que les deux maladies sont identiques sur ces deux cépages. Les symptômes sont d'autant plus aisés à obtenir que le partenaire malade des assemblages de greffe est plus volumineux : la meilleure technique est donc d'utiliser un porte-greffe malade et un greffon sain.

Des différences notables existent cependant dans l'évolution dans le temps des deux maladies. Chez la Flavescence dorée, une fois la virose généralisée dans un vignoble donné, les symptômes apparaissent de façon presque fortuite. Un cep sans symptôme et un cep malade ont autant de chances l'un que l'autre d'être atteint par la maladie l'année suivante.

Nous savons que ce caractère fortuit provient de ce que les rechutes sont provoquées par des réinoculations annuelles des vecteurs. Le virus ne se maintient somme toute qu'en effectuant un cycle, en général annuel, l'amenant de la plante-hôte au vecteur et de celui-ci à la plante (CAUDWELL 1961 a).

Le comportement du Bois noir est en cela bien différent. Ce sont presque toujours les mêmes ceps qui sont malades d'année en année. Ce sont aussi en général les mêmes qui le sont gravement, moyennement ou faiblement. Plusieurs explications peuvent être données à ces différences :

La plus simple consisterait à supposer que la Flavescence dorée et le Bois noir sont provoqués par deux lignées différentes du même virus. Il est également possible que le cycle annuel dont nous avons parlé à propos de la Flavescence dorée s'accomplisse dans le cas du Bois noir par l'intermédiaire d'un vecteur immobile ou qui ne serait infectieux qu'à un stade immobile (CAUDWELL 1961 c).

L'étude de ces diverses possibilités constitue un nouvel aspect des recherches entreprises sur la Flavescence dorée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BRANAS J., 1956. La "maladie" du Chardonnay et les épidémies de Flavescence dorée. Progrès agric. et vitic., 47, 48, 320-325

CAUDWELL A., 1961 a. Les phénomènes de rétablissement chez la Flavescence dorée de la vigne. Ann. Epiph., 12, 3, 347-354

CAUDWELL A., 1961 b. Etude sur la maladie du Bois noir de la vigne : ses rapports avec la Flavescence dorée. Ann. Epiph., 12, 3, 241-262

CAUDWELL A., 1961 c. Etat actuel des recherches sur le virus de la Flavescence dorée. Revue Zool. agric. et appl., 3ème trim., 81-88.

JR/11.2.64

ISOLEMENT D'UN NOUVEAU VIRUS DE LA FEVE

J.C. DEVERGNE & M. SMITH

Nous avons mentionné à plusieurs reprises, l'importance de la fève (Vicia faba, L) comme plante hôte pour de nombreux virus de légumineuses; cette espèce est utilisée à la Station de Pathologie de Versailles pour conserver les différents virus isolés et l'étude d'un complexe sur cette plante a fait l'objet d'une précédente note (Virologie appliquée n°4, 1963.) Nous rapportons ici quelques nouveaux résultats obtenus au cours de l'étude de ce complexe.

1) Symptômes sur fève :

Les symptômes observés à l'origine, sur la fève, sont très caractéristiques : les feuilles de la plante infectée montrent un très net éclaircissement des nervures, accompagné de taches jaunes allongées au voisinage de celles-ci. Cet aspect très reconnaissable, qui fait apparaitre en clair le réseau des nervures de la foliole sur le vert sombre du limbe, a quelquefois été appelé "en aretes de poisson", en raison de la disposition des nervures secondaires par rapport à la nervure principale de la feuille. Les petites plages vert clair, irrégulières, avec ilôts vert foncé et "vein banding" observées dans le cas des infections par les virus des mosaïques du haricot ou du pois, sont ici plus rares. Les folioles du sommet de la plante sont petites et déformées; il peut y avoir nécrose partielle des nervures, visible surtout à la face inférieure, et flétrissement; les pousses axillaires qui se développent alors sont très déformées.

Sur les haricots inoculés, (variétés Pinto, Top Crop), on obtient une mosaïque systémique très marquée avec légère frisolée. Cette réaction suggère la présence d'un virus appartenant au groupe des virus de la mosaïque jaune du haricot (BYMV). La rétroinoculation haricot-fève, reproduit des symptômes de forte mosaïque avec vein-banding; l'éclaircissement des nervures est moins net que chez la fève d'origine; il est cependant très difficile de différencier les deux réactions.

2) Symptômes sur pois.

Différentes variétés de pois ont été inoculées, parmi lesquelles des variétés considérées comme résistantes aux virus des mosaïques jaune et commune; (JUWEL, PRIDE, NEW ERA). Ces dernières variétés réagissent à l'inoculation par des symptômes de marbrure systémique diffuse : les folioles montrent des plages irrégulières plus claires avec "vein clearing" partiel, localisé fréquemment à la base des folioles et qui s'étend ensuite le long des nervures principale et secondaires; les folioles sont

.../...

plus petites et s'enroulent sur les bords; ces manifestations peuvent n'affecter que quelques feuilles seulement. Le symptôme le plus caractéristique est peut être un arrêt de la croissance de la plante infectée, par rapport aux témoins. Enfin, il apparaît quelquefois sur les tiges, de petites nécroses déprimées, brun clair, longitudinales; il peut y avoir flétrissement.

Par rétroinoculation pois-fève, on reproduit sur la fève des symptômes très analogues à ceux du pois; les plages jaunes au voisinage des nervures sont encore présentes mais beaucoup moins accentuées que chez la fève initialement infectée; seules, certaines parties du végétal sont atteintes; de nouvelle feuilles développées apparaissent normales; il y a "recovery", temporaire ou définitive.

3) Examens au microscope électronique

L'existence de deux types de particules a été décelée par examen au microscope électronique d'extraits de fève infectée, partiellement purifiés par ultracentrifugation différentielle (sédimentations successives à 63000 g): - des particules en forme de batonnets flexueux, que l'on retrouve également dans les extraits de haricot, et qui correspondent à un virus de la mosaïque jaune du haricot.

- des particules parasphériques observées dans les extraits de fève et de pois; leur étude au microscope fait l'objet de la communication suivante.

4) Examens sérologiques

Trois sérums ont été réalisés par injections intramusculaires à des lapins, d'extraits de fève et de pois, en présence d'adjuvant de FREUND. Les précipitations sérologiques sont observées en milieu gélosé, selon la technique de double diffusion. La présence dans les extraits, de particules parasphériques est décelée par l'apparition d'une forte ligne de précipitation; cette ligne est visible avec des jus bruts de plantes malades et des dilutions des sérums allant jusqu'à 1/200 ou 1/400è. Elle n'apparaît pas avec les extraits de haricots infectés systémiquement.

5) Propriétés.

Après essais de transmission mécanique du virus parasphérique à différents hôtes, on a obtenu les résultats suivants :

Pois de senteur	: flétrissement des feuilles inoculées; marbrure systémique diffuse; nécroses partielles; rabougrissement.
Trèfle incarnat	: chlorose générale de la plante et rabougrissement.
Fenu grec	: éclaircissement général des nervures et mosaïque.
Melilotus indica	: chlorose et mosaïque diffuse.
Chenopodes	: petites taches nécrotiques peu nombreuses, marginées de brun, sur les feuilles inoculées du Chenopodium amaranticolor.

.../...

larges taches chlorotiques avec flétrissement partiel au voisinage des nervures, sur les feuilles inoculées du Chenopodium quinoa.

Dans les deux cas, il n'y a pas d'infection systémique.

Haricot : Nous n'avons jamais obtenu d'infection systémique du haricot avec les extraits de pois. Cependant une chlorose et un flétrissement rapide des feuilles inoculées (variété Pinto) ont été observés après inoculation avec un extrait de fève concentré par ultracentrifugation et le virus a été décelé sérologiquement dans les feuilles inoculées. Cette expérience ne s'est pas répétée et il semble, de toute façon que le virus ne se généralise pas chez le haricot.

Les inoculations mécaniques du virus au trèfle violet et au trèfle blanc ont toujours été négatives.

Les extraits clarifiés de fève malade perdent leur pouvoir infectieux après traitement à 80° C pendant 10 minutes (inoculation mécanique de fève à fève). La dénaturation par la chaleur s'accompagne de la perte des propriétés sérologiques du virus.

Dans les mêmes extraits, le virus précipite par addition de sulfate d'ammonium à 1/2 saturation; la précipitation est lente et on peut retrouver également une fraction du virus dans le surnageant clarifié; la présence du virus dans les fractions est décelée par précipitation sérologique et par inoculations à la fève.

6) Discussion

Il a été décrit sur la fève, deux virus parasphériques :
- le virus de la marbrure de la fève ("Broad bean mottle virus", BBMV) décrit en 1951 par BAWDEN et ses collaborateurs,

- le virus de la mosaïque vraie de la fève ("Echte Ackecbohne Mosaïc Virus", EAMV) isolé par QUANTZ en 1953.

Bien que le EAMV ait été parfois considéré comme une souche du BBMV, des travaux récents ont manifestement démontré qu'il s'agissait bien de deux virus différents. WETTER, PAUL et QUANTZ (1960) ont mis en évidence un certain nombre de caractères différentiels pour les 2 virus, hôtes spécifiques, température d'inactivation, taille des particules. De plus, les deux virus ne paraissent pas être liés sérologiquement. Le EAMV est également seul transmis par la semence chez la fève.

Enfin, les travaux de PAUL (1961) ont apporté une importante contribution à l'étude physico-chimique des deux virus.

.../...

Comme le EAMV, le virus isolé de la fève ne parait pas infecter le trèfle violet qui est par contre un hôte différentiel pour le BBMV. Bien que les gammes d'hôtes des 2 virus soient par ailleurs voisines, certains caractères observés sur la fève et le pois rappellent ceux décrits pour EAMV ; notamment le très net éclaircissement des nervures puis le phénomène de "recovery" chez la fève, ou encore le rabougrissement avec marbrure diffuse et capricieuse sur le pois.

On remarque cependant que le virus isolé n'infecte que très rarement le haricot alors que cette plante est sensible aux deux virus précédemment décrits, espèce qu'ils infectent systémiquement.

D'autre caractères éloignent également notre isolement du BBMV. Ce dernier virus a une température d'inactivation beaucoup plus élevée (95°) et il ne précipite pas avec le sulfate d'ammoniun à 1/2 saturation.

Enfin, la taille moyenne des particules de EAMV est de 25 µ valeur qui correspond assez bien avec nos mensurations. Le virus du BBMV serait, plus petit, de 17-20 µ de diamètre, bien que cette différence ne paraisse valable que dans le cas d'une étude comparative des deux virus, réalisée selon des techniques rigoureusement identiques.

Outre l'absence nette de réaction chez le haricot inoculé, particularité qui semble caractériser l'isolement étudié, il faut également souligner l'observation suivante :

Le virus seul, ne donne apparemment que très peu de symptômes sur la fève; au contraire, lorsqu'il s'y trouve avec le virus de la mosaïque jaune du haricot, les symptômes propres au virus sont considérablement renforcés.

De plus, les réactions sérologiques comparatives réalisées avec des dilutions d'extraits bruts de fèves, hébergeant soit le virus seul, soit le complexe virus sphérique + BYMV, montrent que le premier virus semble, dans ce dernier cas, beaucoup plus concentré.

Ces observations font penser a un phénomène de synergisme. Des études quantitatives sont malheureusement difficiles lorsqu'on ne possèdent pas d'hôte à lésions locales. Le Vigna sinensis, var. Black, inoculé au stade cotylédonaire, nous a parfois donné des lésions locales, brun rougeâtre ; cette réaction n'a cependant pas été retrouvée assez régulièrement pour qu'on puisse utiliser cet hôte éventuel. (2)

Sur le pois, les symptômes rappellent ceux occasionnés par le virus de la mosaïque des nervures du trèfle violet (RCVMV). Nous avons retrouvé le rabougrissement avec marbrure et nécrose partielle sur des pois issus de semis. On sait que le virus RCVMV est transmis par la graine chez certaines espèces. De même le virus EAMV se transmet dans la semence de fève. La question de la transmission de ce virus chez le pois, ne parait pas avoir été élucidée.

On remarque que le RCVMV est un virus du type bâtonnet.

---

(2) - L'apparition des lésions parait être étroitement liée à la concentration de l'inoculum et au milieu d'extraction. Les relations avec la présence du virus étudié ne sont pas parfaitement établies.

7) Conclusion

La fève est fréquemment infectée en France par un complexe de virus : le virus de la mosaïque jaune du haricot et un virus parasphérique qui semble très proche du virus de la mosaïque vraie de la fève. Cependant le virus isolé n'infecte que très rarement le haricot.

La présence d. BYMV dans la fève semblerait favoriser la multiplication de ce virus.

Le virus infecte le pois. Sa transmission éventuelle par la graine chez cet hôte, mériterait d'être étudiée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BAWDEN, F.C., CHAUDHRI, R.P., KASSANIS, B., 1951. - Some properties of broad bean mottle virus. - Ann.appl. Biol. 38 774-784.

PAUL, H.L., 1961 - Physikalische and chemische.Untersunchungen am broad bean mottle-virus. Z. Naturforschg 16 a 786-791.

PAUL H.L., 1962 - Das Verhalter des Echten Ackerbohnenmosaik Virus in Sedimentations versuchen. Phytopathology Z., 43, 3II-3I9.

PAUL, H.L., BRANDES, J., QUANTZ, L., 1958. Versuche zur Reinigung und Darstellung des Echten Ackerbohnenmosaïk -Virus. Phytopathology Z. 31,441-443

PAUL, H.L., QUANTZ, L., 1959 - Über den Wechsel der Konzentration des Echten Ackerbohnenmosaïkvirus in Ackerbohnen. Arch. Mikrobiol. 32, 3I2-3I8.

QUANTZ L., 1953. Untersuchungen über ein samenübertragbares Mosaikvirus der Ackerbohne (Vicia faba). Phytopathology Z. 20, 42I-448.

WETTER, C., PAUL, H.L., QUANTZ, L., 1960. Vergleich zwischen Eigenschaften des Echten Ackerbohnenmosaik- Virus und des broad bean mottle-virus. Z. Naturforschg, 156, 444-447

WITTMANN, H.G., PAUL, H.L., 1959. Vergleich der Aminosaürenzusammensetzung der Proteine des Echten Ackerbohnenmosaïkvirus, des broad bean mottle-virus und des Tabakmosaïk-virus. Phytopathology. Z., 41, 74-78.

.../...

Deux symptômes caractéristiques du virus parasphérique de la fève (Vicia faba, var. Séville)

A. Eclaircissement des nervures (symptome généralisé sur les jeunes feuilles.)

B. Nécroses et flétrissement (symptôme localisé à quelques feuilles.)

ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE D'UN VIRUS PARASPHERIQUE DE LA FEVE

J.C. DEVERGNE

Les extraits de fève virosée (1) sont particulièrement riches en particules parasphériques. Par ultracentrifugation différentielle, selon une technique de purification précédemment décrite, nous avons obtenu des suspensions très concentrées en virus, qui ont permis de préciser certains aspects morphologiques et anatomiques de ces particules. A partir de suspensions homogènes anciennes, conservées à congélation, nous avons également obtenu le virus dans un état de cristallisation partielle.

Les examens ont été réalisés avec un microscope électronique électromagnétique R.C.A., type EMU 3 B. Les suspensions, déposées sur une membrane support de carbone, ont été préparées selon la technique de coloration négative de BREENER & HORNE (1959) au phosphotungstate de potassium à pH 7.

Taille des particules :

En première approximation, les particules virales peuvent être assimilées à des sphères (virus "rond").

Une évaluation grossière du diamètre de particules fortement contrastées, nous avait donné la valeur de 18 mμ; mais, on peut raisonnablement penser que ces mensurations, effectuées en présence d'un excès d'acide phosphotungstique, conduisaient à une évaluation par défaut, la périphérie des particules pouvant être masquée par l'acide.

Dans le cas de particules isolées, avec faible teneur en acide, le diamètre moyen, calculé après mensurations d'un grand nombre de particules est égal à 25 mμ; des particules témoins du virus de la mosaïque du tabac, ajoutées dans la suspension permettent de définir, alors, avec exactitude, le grandissement des clichés. Comme nous le verrons plus loin, lorsqu'on mesure les distances maxima entre deux "sommets" de la périphérie du virus, les valeurs obtenues peuvent atteindre 29 mμ , principalement dans le cas de préparations anciennes. Enfin, lorsque les particules sont groupées en arrangements compacts, la distance interparticulaire est de 22 mμ.

On peut s'étonner de la variabilité de ces résultats; il faut cependant remarquer que l'évaluation de la taille d'un virus au microscope électronique dépend, au moins de deux facteurs importants :

1) de l'état de deshydratation (ou éventuellement de la dénaturation) de la protéine : une particule complètement deshydratée prend la forme d'un disque plus ou moins aplati dont le diamètre apparent est supérier au diamètre réel du virus.

---

(1) - Voir note précédente "Isolement d'un nouveau virus de la fève". .../...

2) de la méthode de préparation : les techniques d'ombrage fournissent en général, une évaluation par excès; les techniques de coloration négative, une évaluation par défaut ; l'importance quantitative de l'erreur dépend des modalités de chaque technique.

En ce qui concerne les virus de la fève, la taille du "broad bean mottle" BBMV a été évaluée à 17 mμ par BAWDEN et ses collaborateurs, à 20 par WETTER, PAUL & QUANTZ (1960). Le virus de la mosaïque vraie de la fève (EAMV) à un diamètre variant de 25 à 30 mμ . (PAUL & coll., 1958).

Pour le virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV) nous retrouvons également des mesures très différentes qui varient de 20 à 30 mμ selon les techniques utilisées (microscope électronique ou rayons X) et l'état des particules (deshydratation, cristallisation).

Morphologie des particules

En réalité, les clichés montrent très nettement que la particule virale n'est pas une sphère et que sa projection sur le plan de la préparation à la forme d'un polygone régulier (planches I et II). Le plus souvent, il s'agit d'un hexagone à 6 côtés égaux; beaucoup plus rarement d'un pentagone régulier mais dans lequel les côtés ne sont pas tous également visibles (planche I figure 2). Cet aspect polygonal qui avait été observé sur des particules ombrées de EAMV (PAUL, 1958) suggère que le virus a une forme polyédrique régulière.

Certaines particules montrent de plus une sorte de noyau moins dense aux electrons, de forme également polygonale (planche I figures 2 et 4). Les figures, bien que difficilement analysables dans le détail, peuvent être considérées comme des preuves supplémentaires de la forme polyedrique spatiale du virus; les zones claires correspondent en effet à des portions de la particule, plus profondément immergées dans l'acide phosphotungstique.

Cette remarque semble être générale et elle a été confirmée pour tous les virus parasphériques qui ont été l'objet d'une étude structurale approfondie.

On sait que les conclusions, en ce domaine, sont le résultat de deux voies de recherches différentes : d'une part l'étude de la diffusion des rayons X aux petits angles, avec des suspensions de virus purifiés, ou la diffraction des rayons X par les cristaux vrais, lorsqu'il s'agit de virus cristallisables.

d'autre part, l'observation de ces virus au microscope électronique par les techniques d'ombrage, de répliques ou de coloration négative.

Ces conclusions adoptent pour tous les virus étudiés une symétrie 5-3-2 dont le modèle le plus simple est l'icosaèdre régulier. Cette symétrie qui a été retrouvée chez les virus végétaux

.../...

du "bushystuntt", de la mosaïque jaune du navet (TYMV) et du "southern bean mosaïc virus" (SBMV) n'est pas réservée au domaine végétal; le virus de la polio, l' adenovirus 5, les virus du polyome et de l'herpes, comme le "Tipula iridescent virus" chez les insectes possèdent les mêmes caractéristiques cristallographiques.

Cette forme icosaédrique n'est pas incompatible avec l'aspect des particules observées sur les clichés. Lorsque l'icosaèdre repose sur une de ses faces, un de ses axes ternaires étant perpendiculaire au plan d'observation, sa projection orthogonale sur ce plan apparait comme un hexagone régulier. (Schema a).

Si l'icosaèdre repose sur un sommet, ce qui ne saurait être que très rare, un de ses axes d'ordre 5 est alors perpendiculaire au plan d'observation, et la projection du polyedre prend la forme d'un décagone proche du cercle, dans lequel 5 des 10 sommets occupent une position privilégiée, d'où l'aspect pentagonal observé. (schéma b).

On remarquera, que certaines figurent bien que nettement polygonales, ne sont pas régulières. Sur la figure 3 planche II, on observe un hexagone dans lequel 2 côtés opposés sont nettement plus grands que les autres; cet aspect peut être expliqué lorsqu'on observe le polyedre selon une orientation différente (avec un axe binaire perpendiculaire au plan, par exemple) sans pour cela faire appel à une déformation accidentelle de la particule, au cours de sa deshydratation.

Dans le cas d'un hexagone régulier, les mensurations ont donné comme résultats les plus fréquents :

1) distance entre deux côtés opposés : 24,5 - 26,5 mμ
2) distance entre deux sommets opposés: 27 - 29 mμ
3) longueur d'un côté de l'hexagone : 15 - 17 mμ

Structure des particules

Les clichés du virus de la fève montrent deux types de particules: la plupart des particules ont une densité électronique interne à peu près homogène; quelques unes cependant prennent la forme d'une couronne délimitant une cavité centrale plus dense aux électrons ; ces figures correspondent vraisemblablement à des particules creuses dans lesquelles l'acide phosphotungstique a pénétré.

L'isolement chez le TYMV de particules analogues (séparées par ultracentrifugation en gradient de densité) a conduit les auteurs à identifier celles-ci à des virus, non infectieux, dépourvus d'acide nucléique. Ces travaux confirment la position centrale de l'acide nucléique dans le virus, la protéine formant autour de lui, une enveloppe protectrice.

Des particules "creuses" ont ainsi été observées pour un grand nombre de virus végétaux.du type parasphérique. On peut penser que les éléments de même aspect, rencontrés dans les suspensions du virus de la fève, ont par conséquent la même signification.

.../...

Bien que la méthode de coloration négative diminue apparemment l'épaisseur réelle de la coque protéinique, celle-ci reste cependant très mince par rapport au diamètre de la particule ; mesurée sur les clichés, elle ne dépasserait pas 4 mμ

L'hypothèse de CRICK et WATSON selon laquelle la protéine du virus de la mosaïque du tabac serait constituée de sous unités équivalentes, disposées selon un arrangement régulier et caractéristique, a non seulement été confirmée pour ce virus, mais s'applique également aux virus parasphériques.

Le TYMV est actuellement le virus pour lequel la structure de l'enveloppe protéinique est la mieux connue. Les études aux rayons X (KLUG & FINCH, 1957) ont montré la nécessité d'y faire figurer, au moins 60 sous unités cristallographiques (ou un multiple de 60), disposées selon un arrangement régulier possèdant comme nous l'avons vu, la symétrie 5.3.2. Par ailleurs, les études de microscopie électronique (NIXON & GIBBS ; HUXLEY & ZUBAY,1960), ont décelé la présence de 32 sous unités morphologiques disposées également selon un arrangement satisfaisant à cette condition : 12 sous unités seraient situées aux 12 sommets d'un icosaedre régulier et 20 sous unités approximativement aux centres des 20 faces,(ou plus exactement aux sommets d'un dodécaedre pentagonal). L'ensemble forme alors un polyedre régulier à 32 sommets qui pourrait être un triacontaedre rhomboedrique. Cette structure hypothétique doit, de plus, être compatible avec les résultats de l'analyse chimique, chaque unité cristallographique ou morphologique pouvant être alors constituée de sous unités chimiques plus petites.

L'existence de sous unités est également suggérée sur les clichés du virus parasphérique étudié. Les anneaux polygonaux des particules creuses (planche I) montrent des corpuscules de contour diffus situés préférentiellement aux sommets. Ces granules clairs ont très approximativement 4 mμ de diamètre. Ils pouraient correspondre à des sous unités qui, si nous adoptons l'hypothèse icosaedrique seraient situées aux sommet de l'icosaedre.

L'observation de suspensions anciennes est plus intéressante (planche II). Les particules semblent en effet constituées de granules dont la disposition reste souvent mal définie, mais parait régulière. Dans quelques cas provilégiés cependant, on peut distinguer nettement un arrangement de 6 unités autour d'une unité centrale (planche II figure4). Ce schema est le seul que nous ayons pu reconnaitre de façon certaine. Il ne s'explique cependant que si l'on envisage l'existence de sous unités placées sur un axe de symétrie ternaire, par exemple au centre des faces de l'icosaedre. Cette disposition a été observée pour le TYMV ; d'autres dispositions ont été nécessaires pour définir le schema proposé plus haut mais, un schema similaire pour le virus de la fève n'est pas incompatible avec les aspects observés sur les clichés que nous avons obtenus.

On peut remarquer que cette disposition des 7 sous unités ne se situe pas au centre de la particule; l'anneau est toujours excentré ce qui semble indiquer que la particule ne repose pas exactement sur une face de l'icosaedre.

.../...

Le fait que les sous unités sont plus apparentes dans certaines préparations anciennes que dans des suspensions récemment purifiées, pourrait s'expliquer par un début de dénaturation de l'enveloppe protéinique permettant une pénétration superficielle de l'acide. Dans ces préparations nous avons également observé des éléments isolés de petite taille, plus ou moins annulaires, dont l'aspect est tout à fait semblable à celui d'éléments observés par THOMAS& HORNE (1961) dans des préparations de bactériophages Ø X174. Ces éléments pourraient être des sous unités qui se seraient détachées de la capside.

Observations du virus cristallisé

Dans les préparations réalisées avec des suspensions suffisamment concentrées, les particules virales ne sont pas disposées au hasard; on observe fréquemment des plages où les virus sont groupés en arrangements compacts de type hexagonal (planche I, fig.1) rappelant les alvéoles d'un rayon de cire.

Cette disposition peut être considérée comme le schéma le plus logique selon lequel des particules hexagonales régulières se rapprochent les unes des autres, au cours de la deshydratation, sans qu'il s'agisse pour autant de véritable cristallisation. Ces arrangements affectent cependant des formes polygonales (planche III, fig.1) qui suggèrent l'existence de véritables liaisons.

Parfois, les particules sont disposées en plusieurs couches superposées (planche III, fig.2) et l'aspect prend alors la signification de véritables fragments cristallins.

Tous les virus pour lesquels la structure protéinique commence a être connue sont des virus cristallisables; en effet, ce sont essentiellement les observations cristallographiques qui ont fourni les éléments de départ de ces études. CASPAR (1956) a montré que le virus du "bushy stunt" cristallisait dans le système cubique et le même mode de cristallisation a été confirmé pour beaucoup d'autres virus étudiés (2). Par voie de conséquence la particule virale elle-même foit posséder une certaine symétrie qui peut être 2.3, 4.3.2 ou 5.3.2. Nous avons vu que cette dernière avait été retenue après examen des diagrammes de diffraction. La symétrie d'ordre 5 n'est pas cristallographique, mais il n'y a pas vraiment contradiction car la particule virale n'est qu'un motif dans la cristallisation et n'est pas astreinte aux mêmes exigences de symétrie que le réseau.

Les observations au microscope rendent compte de certains aspects de cette cristallisation; on peut rappeler à ce sujet les travaux de WYCKOFF (1956) sur le "southern bean mosaïc virus". La technique des répliques permettait de déceler la structure superficielle des cristaux de SBMV et différents types d'arrangement observés pouvaient correspondre en effet aux aspects qu'auraient différentes faces d'un cristal de symétrie cubique, situées dans des plans réticulaires simples. Parmi ces aspects, on remarque l'arrangement hexogonal, noté ci-dessus et l'arrangement cubique.

---

(2) Selon MAGDOFF (1960) et contrairement aux autres virus et à d'autres travaux, le SBMV cristallisait cependant dans le système orthorhombique.

.../...

De même, les clichés obtenus avec le virus de la fève, montrent des fragments de cristaux disposés selon des plans différents, dont deux types principaux et plus directement analysables sont illustrés sur la planche III (fig.3 et 4):

L'arrangement hexagonal (fig.4) peut être interprété ici comme deux couches superposées de particules; la disposition relative des particules dans les deux couches consécutives est représentée sur le schéma d, une couche étant figurée en traits pleins, l'autre en pointillés; cette disposition explique le découpage apparent de chaque particule virale, en trois secteurs égaux suivant un tracé qui correspond aux côtés des hexagones de la deuxième couche (3). On réalise expérimentalement un arrangement de ce type en disposant des icosaedres régulières reposant sur une de leur face (axe ternaire perpendiculaire au plan) de telle sorte que chaque icosaedre soit entouré par 6 modèles identiques adjacents et possède avec chacun d'eux une arête commune. Les 6 sommets de la projection orthogonale de la particule, appartiennent ainsi chacun à 3 particules en contact; on peut remarquer cependant que ces sommets sont la projection de points de contact disposés plus ou moins bas selon la direction perpendiculaire au plan, et se partagent en deux groupes de 3. La coloration à l'acide phosphotungstique rend parfaitement compte de cette symétrie 3, les cavités les plus profondes entre 3 particules correspondant à des zones où l'acide s'est accumulé (zones sombres).

Cette accumulation d'acide donne grossièrement à la particule l'aspect d'un triangle curviligne, par escamotage de 3 des 6 sommets de l'hexagone (voir également schema d)

L'observation par la technique de coloration négative de fragments cristallins vus sous cet angle, rend ainsi compte de certaines particularités spatiales de la forme icosaedrique.

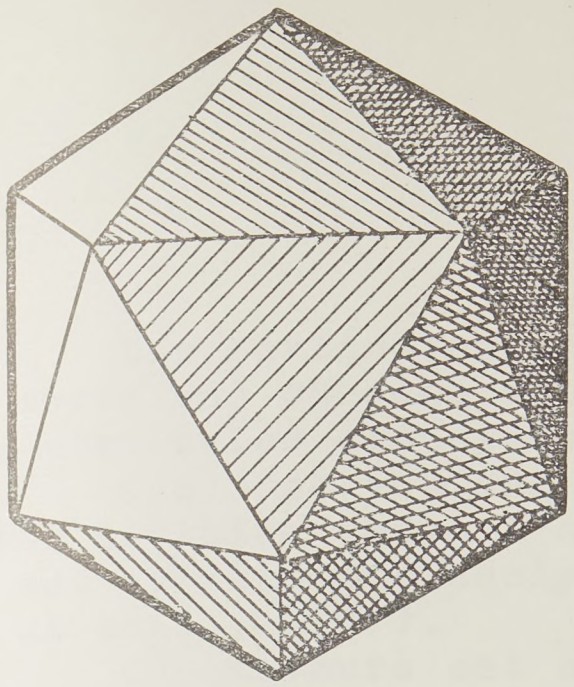
Le deuxième type d'arrangement est l'arrangement cubique illustré planche III fig. 4. Si la cristallisation du virus se réalise dans le système cubique, cet aspect serait celui du cristal vu selon un plan parallèle à une face de la maille.

La technique de coloration négative, permet de déceler ici encore la forme hexagonale du motif viral. On remarque alors que toutes les particules ne sont pas orientées dans la même direction mais que chacune d'elle est disposée perpendiculairement à ses voisines, comme si l'on passait de la position d'une particule à celle de sa voisine la plus proche par une rotation de 90°. Les contacts entre particules apparaissent en projection orthogonale selon le modèle sommet contre face, un sommet de l'hexagone chevauchant le côté de l'hexagone le plus proche; la disposition des quatre particules en carré est celle reproduite sur le schema c; les quatre motifs délimitent une étoile centrale de forme très caractéristique qui apparait nettement sur les clichés.

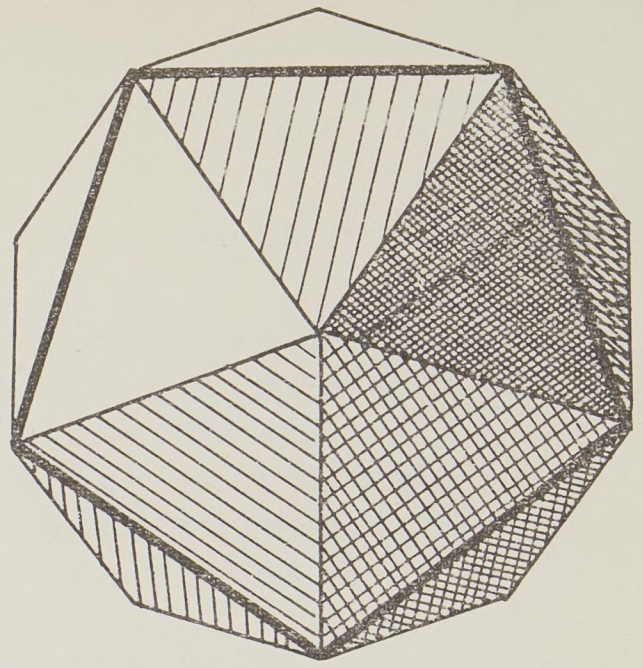
---

(3) Dans le cas ou il y a trois couches superposées, chaque particule semble être divisée en 6 secteurs comme cela apparait sur certains fragments cristallins de la fig.2 planche III

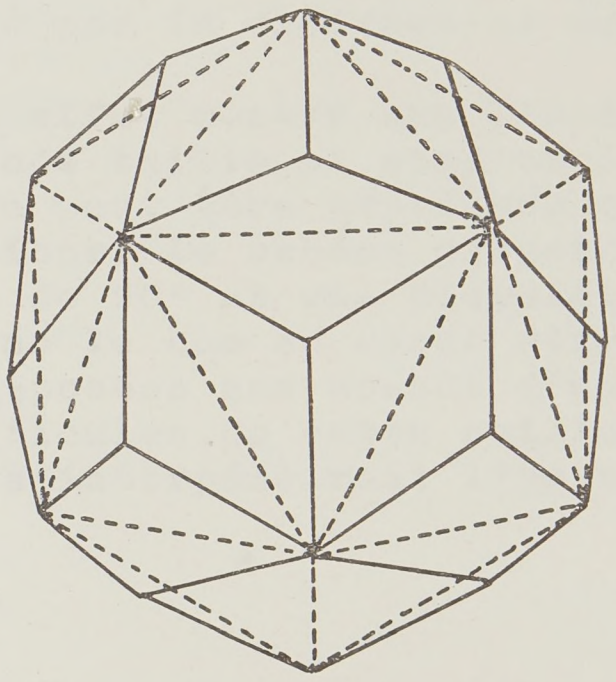
SCHEMAS



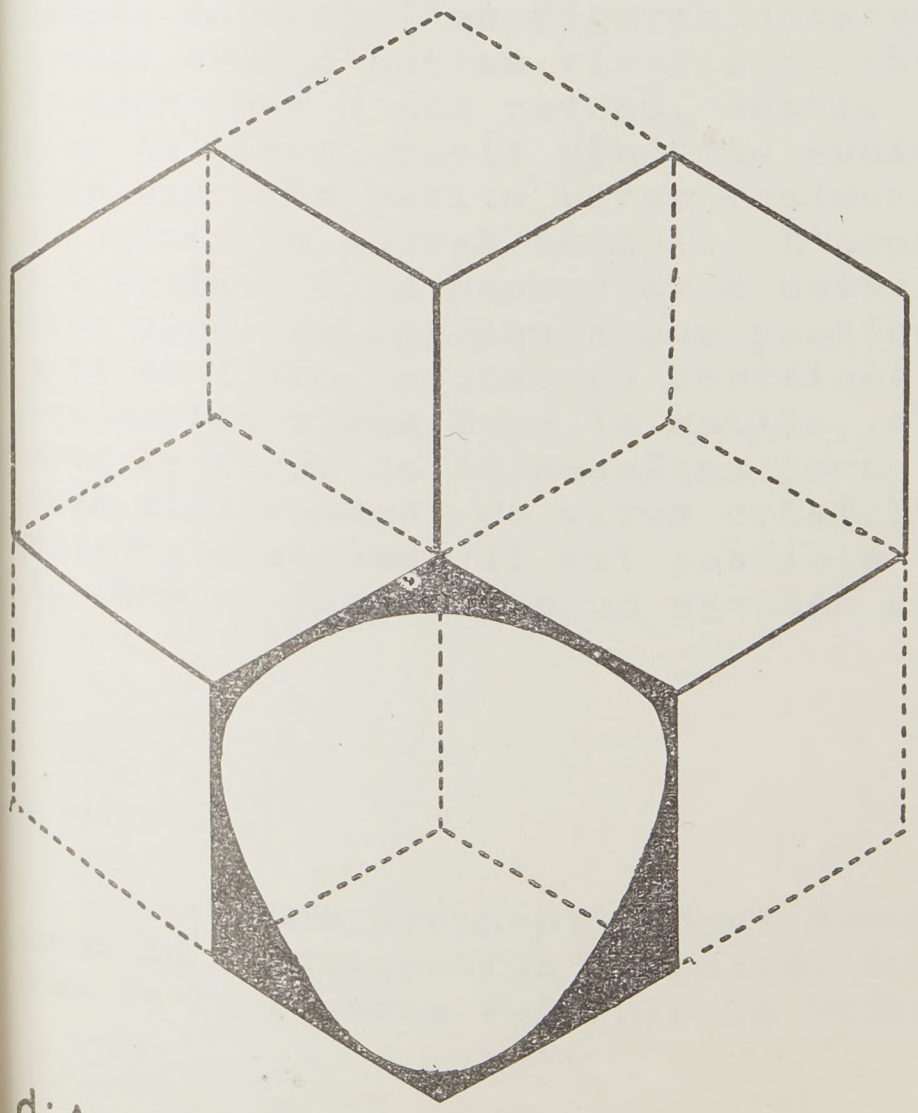
a : Modèle icosaèdrique
reposant sur une face
(aspect hexagonal)



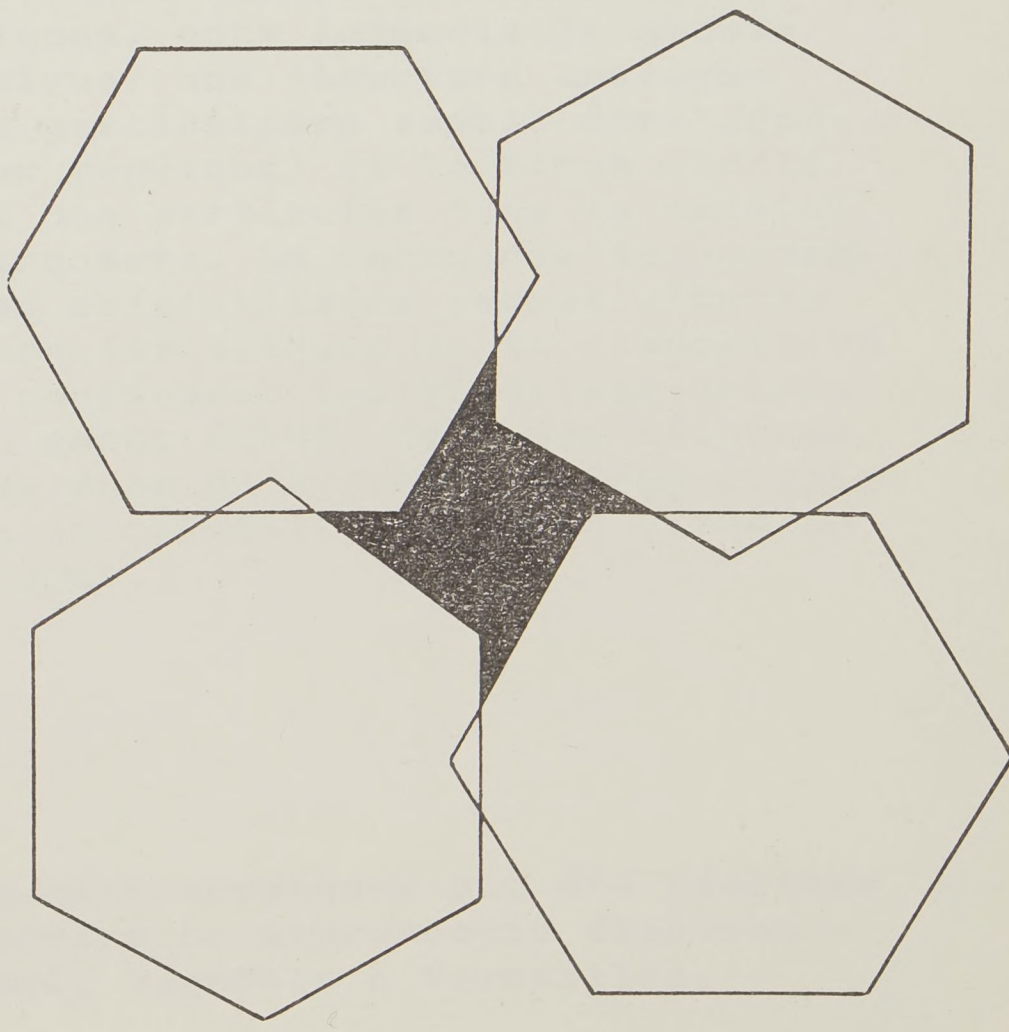
b: Modèle icosaèdrique
reposant sur un sommet
(aspect pentagonal)



c: Triacontaèdre rhomboèdrique
(en pointillés: l'icosaédre initial)



d: Arrangement hexagonal
en deux couches superposées
(la particule du bas montre l'aspect



e: Arrangement cubique montrant les deu
orientations différentes de 90 degrés.

Les particules dans la deuxième couche sont disposées de telle sorte que chacune occupe une position centrale par rapport à quatre particules disposées en carré dans la première couche.

Ces observations permettent de penser qu'il existe une analogie certaine entre l'arrangement du virus étudié et celui du TYMV, tel qu'il a été analysé par la diffraction des rayons X (KLUG et coll., 1957).

Ces auteurs ont en effet montré que l'unité cristalline cubique du TYMV était de grande taille et comprenait 16 particules virales; cette observation ne peut être expliquée que si les particules ont plusieurs orientations. Le schéma proposé fait intervenir deux orientations distinctes de 90° et une disposition que nos clichés paraissent confirmer dans le cas du virus étudié. Selon KLUG, les particules de TYMV sont disposées aux noeuds d'une maille cubique à faces centrées, les 16 particules de cette maille formant deux schémas de type diamant qui s'interpénètrent l'un dans l'autre.

Conclusions

La technique de coloration négative au phosphotungstate de potassium a été utilisée pour l'examen au microscope électronique d'un virus parasphérique de la fève, en suspension et cristallisé. La particule virale parait être constituée de sous unités morphologiques, disposées selon un arrangement polyedrique régulier. La ressemblance de certaines figures observées, avec celles précédemment obtenues avec d'autres virus parasphériques, pour lesquels le modèle icosaedrique a été retenu, semble indiquer une structure analogue pour ce virus. Cette symétrie cubique particulière semble être générale pour les petits virus (animaux ou végétaux) et le virus étudié en serait un nouvel exemple. L'aspect des particules dans le cristal est également en accord avec cette structure. La technique de coloration négative appliquée aux particules cristallisées permet d'autre part de faire apparaître certaines caractéristiques de la disposition des motifs virus dans la maille, qui confirment les résultats obtenus pour le virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV) avec des méthodes très différentes. Ce virus cristallise dans un système cubique simple à faces centrées. Il est possible que la cristallisation du virus de la fève se fasse dans un système analogue.

Les préparations et examens microscopiques ont été réalisés avec la participation technique du service de microscopie électronique de la Station Centrale de Pathologie Végétale à Versailles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERNAL (JD) & FANKUCHEN(I) 1941. - X-Ray cristallographic studies of plant virus preparations. J. Gen. Physiol.25, 111,(165)

BREENER (S) & HORNE (R.W). 1959. - A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. - Biophys. Acta 34, 103-110.

CASPAR (D.L.D.) 1956 - Structure of bushy stunt virus. Nature 177 (475-476)

CRICK (F.H.C.) & WATSON (J.D) 1956 - Structure of small viruses. Nature 177, 473-475.

FINCH (J.T) & KLUG (A) 1959 - Structure of poliomyelitis virus. Nature 183, 1709-1714.

HALL (C.E.), MAC LEAN (E.C.) & TESSMAN (I) - 1959 - Structure and dimensions of Bactériophage Ø X 174 from Electron Microscopy. J. Mol. Biol.1, 192-194

HORNE (R.W.), BRENNER (S), WATERSON (AP) & WILDY (P) 1959. The icosahedral form of an adenovirus. J. Mol. Biol. 1, 84-86

HORNE (RW) & NAGINGTON (J). 1959 - Electron microscope studies of the développment and structure of poliomyelitis virus J. Mol. Biol. 1, 333-338

HORNE (RW) & WILDY (P) 1961 - Symmetry in virus architecture. Virology 15, 3, 348-373

HUXLEY (HE) & ZUBAY (G) 1960 - The structure of the protein shell of turnip yellow mosaïc virus. J. Mol. Biol. 2, 189-196.

KLUG (A), FINCH (JT) & FRANKLIN (RE) 1957. Structure of turnip yellow mosaïc virus: X-ray diffraction studies. Biochim. Biophys Acta 25, 242-252

KLUG (A), FINCH (J.T) & FRANKLIN (R.E) 1957. - Structure of turnip yellow mosaïc virus. Nature 179, 683-684

KLUG (A) & FINCH (J.T) 1960 - The symmetries of the protein and mucleic acid in turnip yellow mosaïc virus : X-Ray diffraction studies. J. Mol. Biol. 2. 201-215.

KLUG (A) & CASPAR (OLD) 1961 - Structure of small viruses. Advances in Virus Research 7 , 225-325

.../...

MAGDOFF (B.S) - 1960 . The structure of small " "spherical viruses". Trans New York Acad. Sci. 22 (7) 522-527.

MAGDOFF (B.S) 1960 - Subunits in southern bean mosaïc virus Nature 185, 673-674

NIXON (H.L) & GIBBS (AJ) 1960 - Election microscope observations on the structure of turnip yellow mosaic virus

PRICE (WC), WILLIAMS (RC) & WYCKOFF (RWG) 1946. - Electron micrographs of crystalline plant viruses. Archiv. Biochem. 9, 175-185.

THOMANS (WJ) & HORNE (R.W) 1961 - The structure of bacteriophage Ø X 174. Virology 15, 1-7.

WILDY (P), RUSSELL (W.C) & HORNE(R.W.) 1960 - The morphology of herpes virus. - Virology 12, 204-222.

WILDY (P), STOKER (MGP) MACPHERSON (IA) & HORNE (R.W) 1960 - The fine structure of polyoma virus. Virology 11, 444-457.

WYCKOFF (R.W.G.) 1956 - Symposium on Biophysics. Annual meeting of the american - Physical Society New-York.

LEGENDE DES PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

PLANCHE I

1 - Aspect d'une suspension concentrée dans laquelle les particules s'agglomèrent suivant une disposition hexagonale (x 200.000)

2 à 6 - Détails des particules x 540.000
On remarque la forme hexagonale ou plus rarement pentagonale, les particules "creuses" et la localisation de sous unités aux sommets des polygones.
Les clichés 5 et 6 révèlent également la forme polyédrique des particules dans l'espace par l'observation des "noyaux" de faible densité, de contour polygonal.

PLANCHE II

1 - Aspect d'une suspension ancienne (x 400.000)

2 à 6 - Détails des particules x 615.000

On décèle les sous unités protéiniques disposées régulièrement. Les clichés 4 et 6 montrent un anneau de 6 sous unités entourant une sous unité centrale.

PLANCHE III

1 - Agglomération des particules en figures régulières

2 - Aspect d'une préparation de virus cristallisé (x 150.000

3 - Détail de l'arrangement cubique (x 240.000)

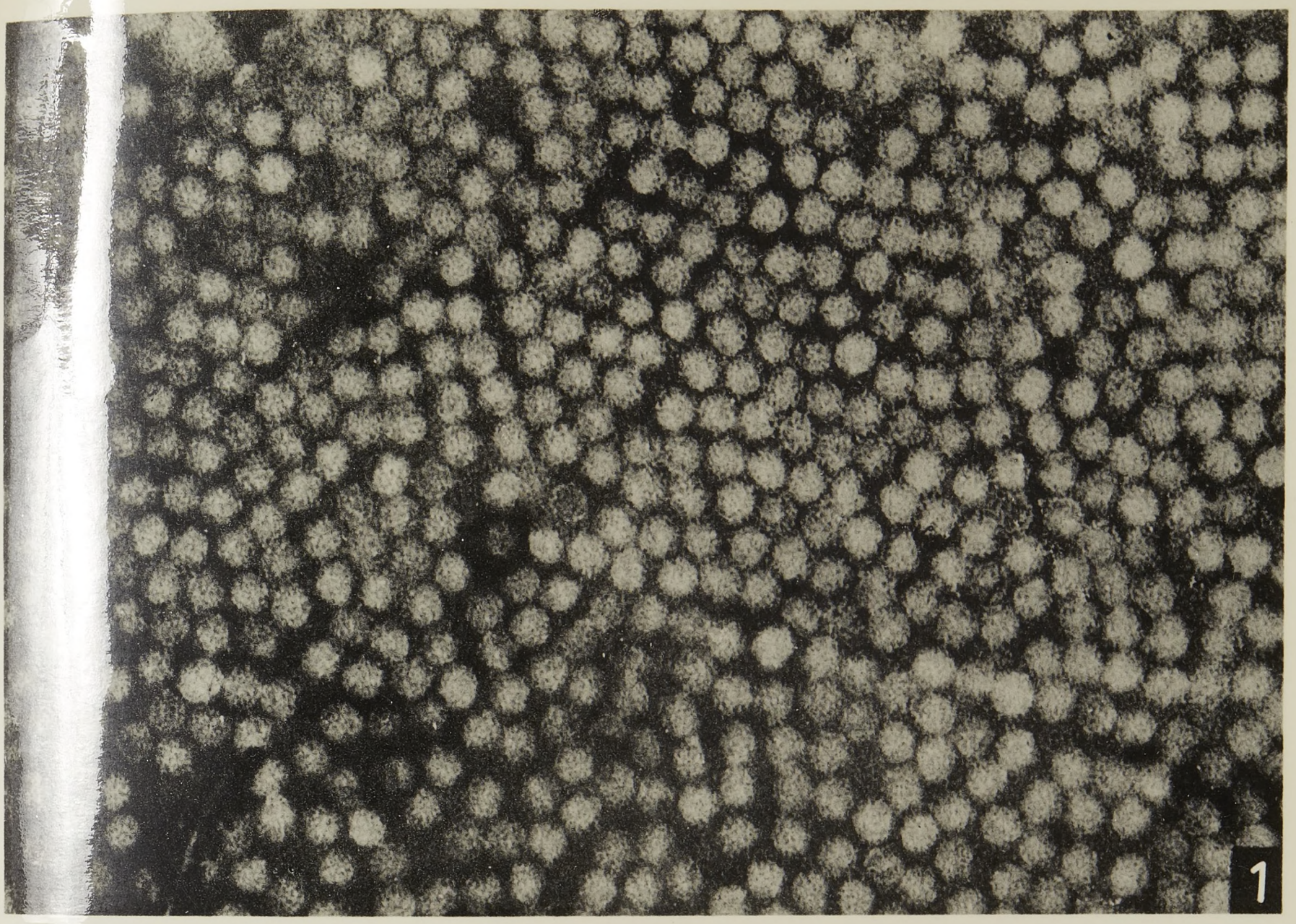
4 - Détail de l'arrangement hexagonal en deux couches superposées (x 240.000).

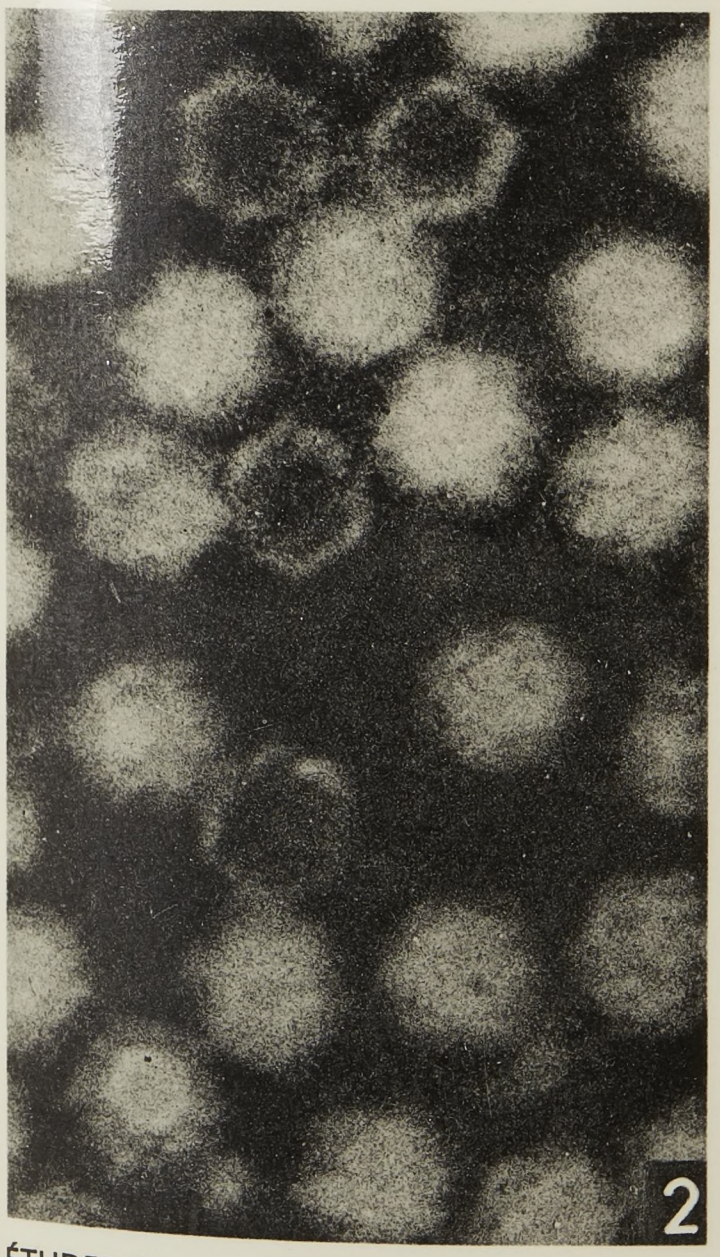
Erratum : Dans le texte page 18, lire
=======

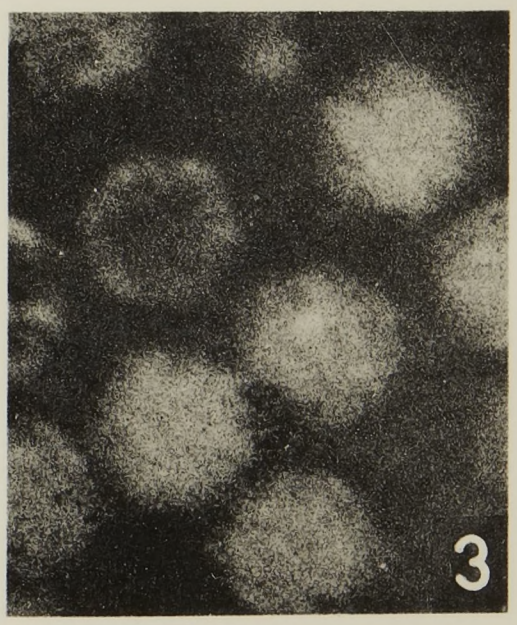
"l'arrangement cubique illustré planche III fig.3"

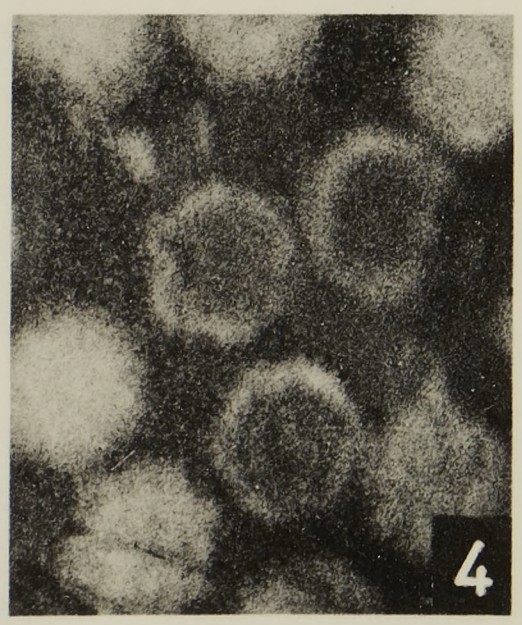
au lieu de :

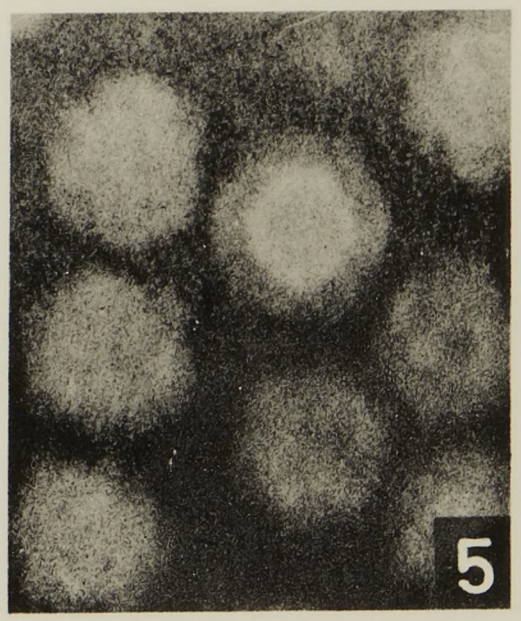
"l'arrangement cubique illustré planche III fig.4"

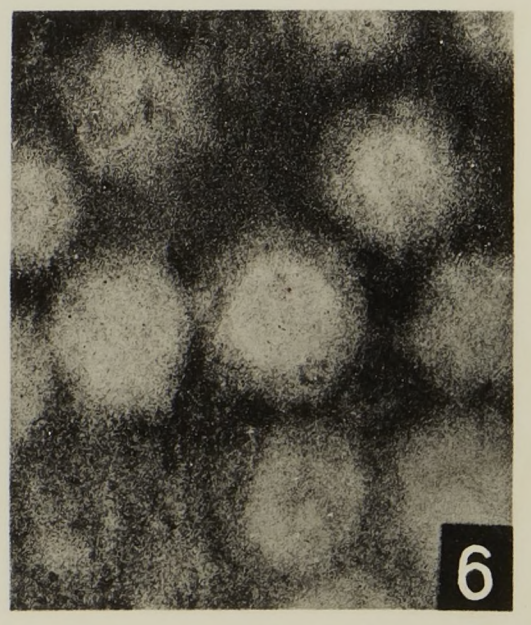

1

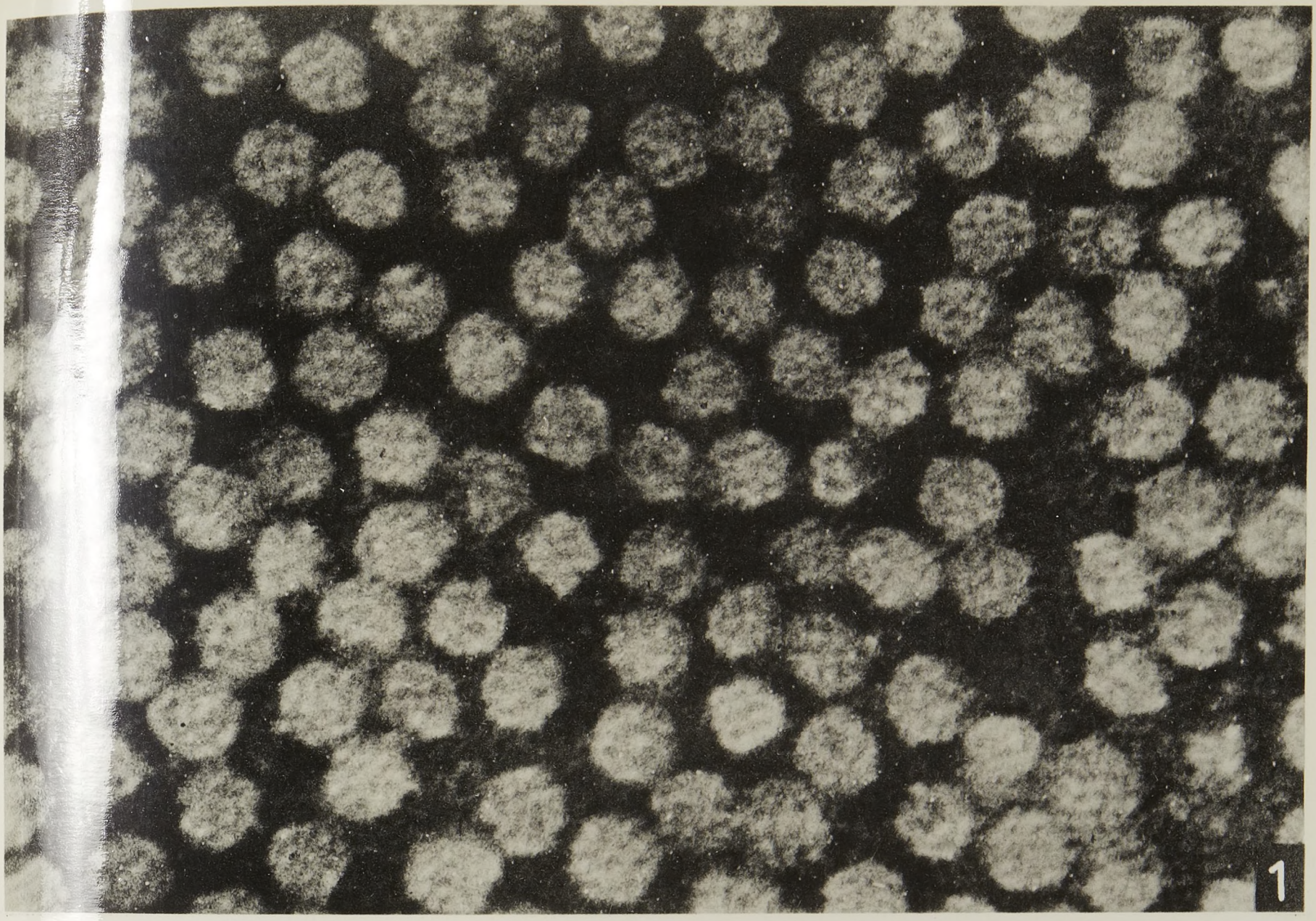

2

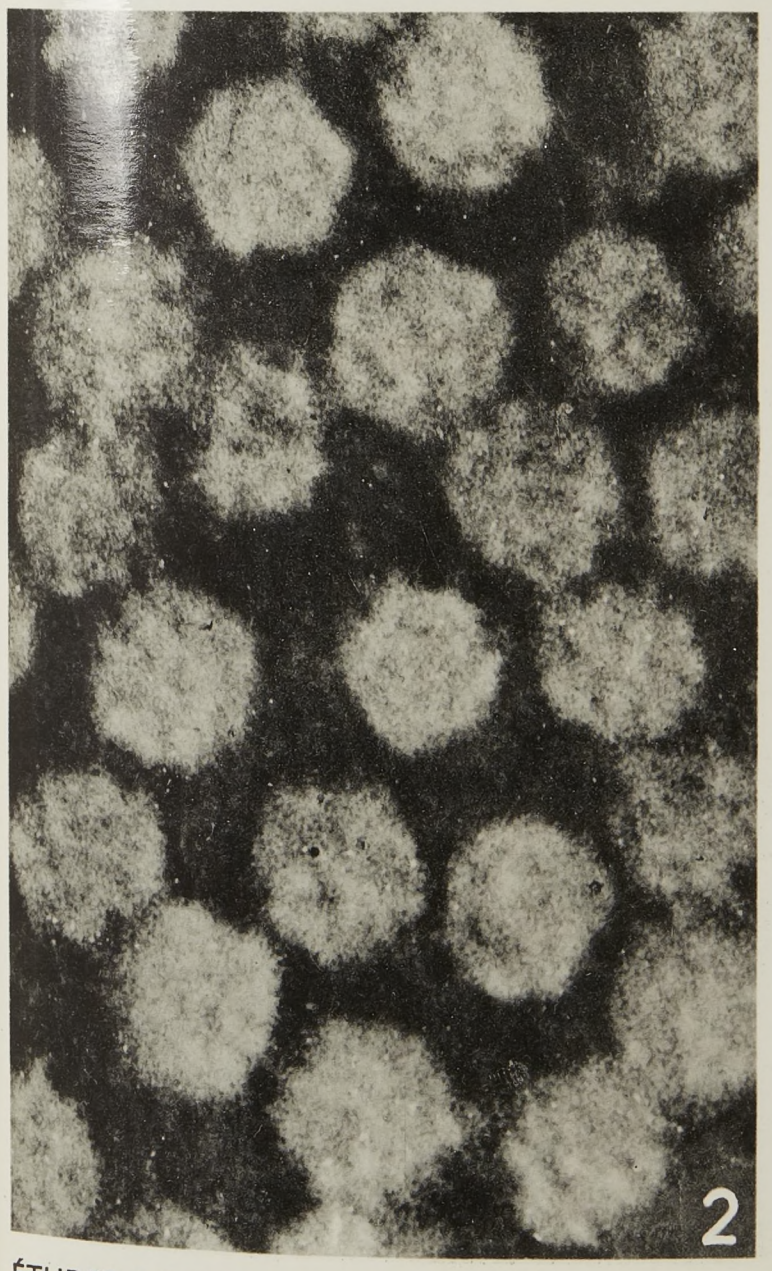

3

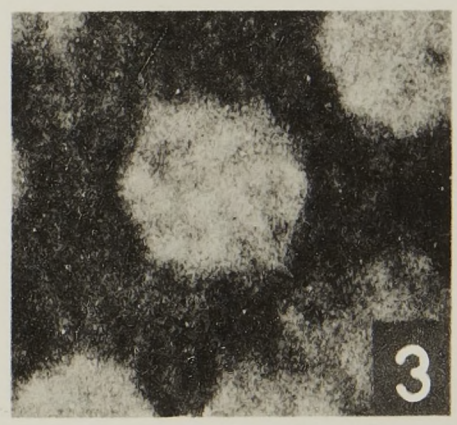

4

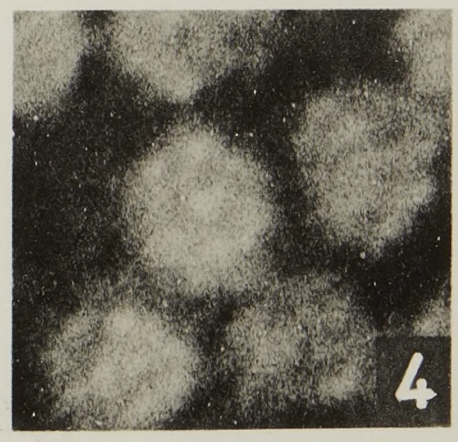

5

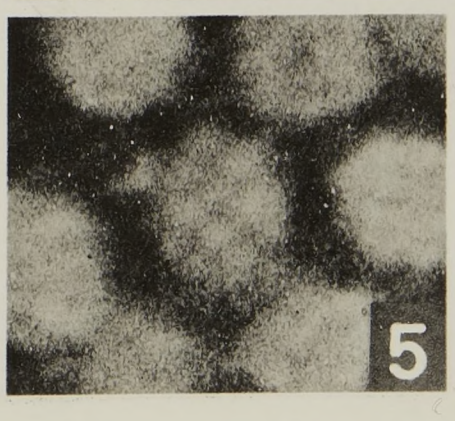

6

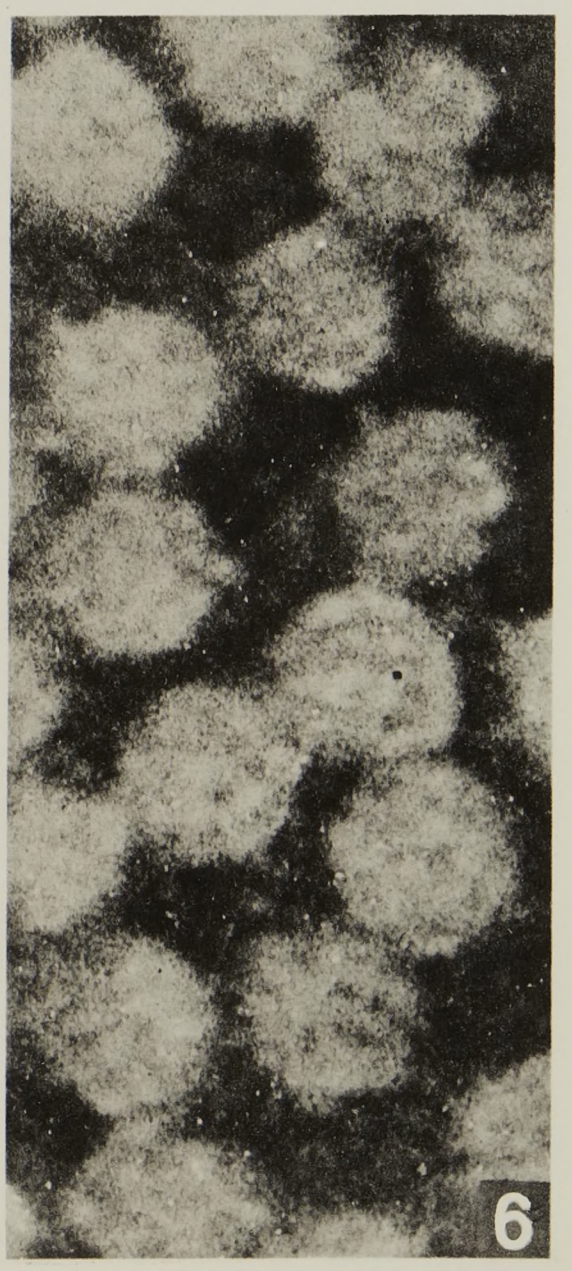












ÉTUDES DE VIROLOGIE APPLIQUÉE
J.-C. Devergne

N° 5 - 1964
Planche II

PRESENCE D'UN VIRUS LATENT DANS PLUSIEURS VARIETES FRANCAISES ET NORD-AFRICAINES D'ARTICHAUT

-:-:-:-:-:-:-

E.POCHARD S.MEHANI J.MARROU

-:-:-:-:-:-:-

Dès 1958, la Station d'Amélioration des plantes de Montfavet a commencé à réunir une collection d'artichaut, comprenant des représentants de trois principales populations actuellement cultivées en France : Violet de Provence, Camus de Bretagne et Blanc Hyérois (appelé aussi Macau).

Ces variétés sont multipliées uniquement par voie végétative au moyen de rejets de souche, connus sous le nom d'oeilletons par les agriculteurs. En 1961, quelques descendances ont été obtenues par voie sexuée en vue de réaliser une étude génétique du matériel végétal disponible. Disposant ainsi d'un matériel de référence, nous avons pu constater la faible vigueur des plantes issues de multiplication clonale par rapport aux plantes issues de graines. L'examen des clones montre aussi qu'ils sont inégalement atteints par cette baisse de vigueur et qu'ils présentent à des degrés différents cet ensemble de symptômes que les agriculteurs désignent sous le nom de dégénérescence. Il s'agit de modifications irréversibles : les oeilletons prélevés sur des plantes naines et plus ou moins jaunâtres, donnent eux-mêmes des plantes chétives ou sont éliminés faute d'un enracinement suffisant.

Nous avons pensé que ces phénomènes de dégénérescence pouvaient être provoqués par un ou plusieurs virus.

Trois viroses ont été décrites sur artichaut (GIGANTE 1949, LEACH & OSWALD 1950, COSTA & DUFUS 1959, MORTON 1961) Le travail de COSTA & DUFUS nous a particulièrement intéressé. Ces auteurs ont étudié les propriétés d'un virus latent répandu dans les cultures d'artichaut de Californie. L'hôte différentiel de ce virus est le Chenopodium amaranticolor (COSTE & REYN).

I. MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE D'UN VIRUS LATENT DANS DIFFERENTS CLONES D'ARTICHAUT.

Méthodes de travail.

Dans les premiers tests, nous avons utilisé le frottis direct de la jeune feuille d'artichaut, roulée en cigare, sur la feuille de C.amaranticolor. Dans d'autres essais, nous avons extrait le virus par broyage de 1gr. de feuille dans 5cc. de sulfite de Sodium à 3‰. Les résultats les plus réguliers ont été obtenus par frottis direct, bien que le nombre moyen de lésions ait toujours été assez faible : 4 à 5, avec un maximum de 45 par feuille.

L'age et l'état physiologique de la plante ont une grande influence sur la sensibilité de C.amaranticolor au virus latent de l'artichaut. Les plantes élevées en jours très courts fleurissent rapidement et ne sont pas utilisables. En jours longs, les feuilles durcissent, accumulent des réserves d'amidon et perdent toute sensibilité. Pratiquement les meilleurs résultats ont été obtenus en Octobre-Novembre et Février-Mars. Dans un essai comportant 25 feuilles par traitement, on a obtenu en moyenne 5,4 lésions par feuille de Chenopode élevé en jours courts naturels (Février). Les Chénopodes placés sous un éclairage artificiel de 16 heures n'ont donné que 0,8 lésions par feuille, et ces mêmes plantes, placées à l'obscurité pendant trois jours avant l'inoculation, ont donné 0,9 lésions par feuille.

Sur une plante élevée dans les conditions les plus favorables, les feuilles les plus réactives sont celles qui ont presque atteint leur taille adulte sans, toutefois, avoir terminé leur croissance.

Clônes appartenant à la population des Violets porteurs d'un virus latent.

Les numéros suivants ont donné des lésions parfaitement identifiables :

VP.I8 2I 4I 45 73 I02 I06 30I 422 7II
V.du Gapeau, CP.II, CM.4, Algérie-Tunisie I.

Ces clônes ont été choisis pour couvrir la plus large gamme possible d'origines géographiques, de types morphologiques et de précocité. On trouve, ainsi, des plantes contaminées aussi bien à Hyères qu'à Perpignan, en Corse ou en Afrique du Nord.

Quinze autres clones, testés à une époque plus tardive, ont donné également des lésions mais les feuilles inoculées sont tombées avant d'avoir pu extérioriser les symptômes les plus nets. En fait, aucune des plantes testées n'a donné de réponse négative. Si les échantillons étudiés sont bien représentatifs, on pourrait admettre que l'ensemble de la population des Violets est porteuse d'un virus latent.

Tous les clônes étudiés ne paraissent pas également touchés par cette virose. Dans un essai réalisé en Février 1963, on a obtenu les résultats suivants :

Clônes :	VP.45	VP.106	VP.41	AT.1	CP.11
Nb.de lésions:	14,2	7,6	3,0	1,8	0,2

Les différences variétales sont significatives au niveau 1%. (différence significative 5% : 5,8). Dans le cas de AT.1 et CP.11 on peut sans doute faire intervenir l'effet d'un transfert en serre plus précoce de deux mois : la croissance de l'artichaut y est très faible pendant la saison hivernale ce qui entraine probablement une faible multiplication du virus.

Par contre, les trois autres clônes semblent bien présenter des différences réelles. Il est curieux de constater que leur classement est identique à celui que l'on observe pour la résistance à l'hiver, VP.41 étant le plus résistant.

Clônes appartenant à d'autres variétés, porteurs d'un virus latent.

Dans le type Blanc-Précoce, les deux clônes dont nous disposions se sont révélés infectés :

Blanc d'Oran (Can.21)
Tudela (Val.1)

Dans le type Blanc-Tardif, les cinq clônes de Blanc-hyerois que nous avons testés se sont révélés porteurs d'un virus. Le clône BH.304 qui présentait des symptômes de nanisme et de jaunissement très marqués a donné, en moyenne, 22 lésions par feuille, soit trois fois plus que les autres clônes.

Variétés paraissant indemnes.

Cinq origines différentes de Camus de Bretagne ont été testées : Côtes-du-Nord, Maine-&-Loire, Gironde, Tarn-&-Garonne, Var. Aucune lésion locale n'a pu être observée sur C.amaranticolor. Il faut cependant remarquer qu'un seul clône a chaque fois été utilisé.

Les plantes issues de semis que nous avons testées se sont révélées indemnes, même celles provenant du clône BH.304 cité plus haut. Il semble donc bien que ce virus ne soit pas transmissible par la graine. Pour pouvoir l'affirmer avec certitude, il faudrait cependant étudier systématiquement un plus grand nombre de descendances.

.II. AMELIORATION DES TECHNIQUES D'INOCULATION DU VIRUS.

Les jus extraits de feuille d'artichaut brunissent rapidement et perdent une grande partie de leur pouvoir infectieux. Il s'est avéré nécessaire de mettre au point des techniques susceptibles de préserver des oxydations les broyats de feuilles.

La présence de sulfite de sodium permet d'obtenir des jus qui restent clairs et gardent leur couleur verte. Cependant, le nombre de lésions locales obtenues sur C.amaranticolor reste très faible, du même ordre de grandeur que ce que l'on obtient par frottis direct.

Les phénomènes d'oxydation ne sont donc pas seuls à l'origine de la perte du pouvoir infectieux. Les faibles taux de transmission pourraient être dus à la présence d'inhibiteurs d'installation du virus. Pour vérifier cette hypothèse nous avons essayé d'une part de diluer l'inoculum, d'autre part de fixer l'inhibiteur présumé sur du charbon végétal.

1°- Dilution de l'inoculum.

Matériel et méthodes :

a) Source d'inoculum : les clônes VP.45 et VP.IO2, cités au chapitre précédent, ainsi que quelques plantes provenant de Tunisie, et présentant des symptômes de jaunissement marqués, ont fourni l'inoculum. Dans les expériences préalables, VP.IO2 et Tn.3 se sont montrés pratiquement équivalents et ont donné un peu plus de lésions sur C.amaranticolor que VP.45. Dans l'essai rapporté ci-dessous, seul VP.IO2 a été utilisé.

b) Solution d'extraction : les solutions utilisées pour l'extraction des jus infectieux étaient composées d'un tampon biphosphate (disodique et monopotassique) additionné de sulfite de sodium. Deux solutions ont été utilisées ; traitements A et B: 0,02 M et pH 7. Traitements C et D : 0,5 M et pH 7,5.

c) Extraction : les jus A et C ont été obtenus en broyant au mixer une partie de feuille dans une partie de solution (g/ml), les jus B et D, en broyant une partie de feuille dans quatre parties de solution.

d) Inoculation : L'inoculation a été réalisée mécaniquement par frottis en présence de carborundum. Quatre plantes de C.amaranticolor ont été choisiés, et quatre feuilles sur chacune de ces plantes dans la partie moyenne de la tige. Chaque traitement a figuré successivement à chacun des niveaux de la tige pour pouvoir analyser à la fois l'effet du rang de la feuille et l'effet de la plante.

Résultats.

Les résultats consignés au Tableau I mettent en évidence des différences entre les quatre traitements. Les fortes molarités des solutions tampon sont nettement défavorables. Par ailleurs, les extraits peu dilués (I/2) donnent moins de lésions que les extraits plus dilués (I/5). Cette augmentation du pouvoir infectieux avec la dilution est caractéristique des extraits renfermant des substances inhibitrices. La limite de dilution de ces dernières est plus rapidement atteinte que celle du virus. Dans les essais ultérieurs, nous avons toujours utilisé une dilution de I/5 avec un tampon 0,02M, additionné de sulfite de sodium 0,02 M.

Cette formule correspond à celle utilisée par COSTA & DUFUS (I959).

TABLEAU I

Traitement	Solution d'extraction (+ SO_3Na_2 0,02 M)	Dilution.	Nombre de lésions	Nb. de lésions par feuille
A	T.ph 0,02 M pH 7	I/2	43	IO,8
B	T.Ph. 0,02 M pH 7	I/5	60	I5,0
C	T.Ph. 0,5 M pH 7,5	I/2	0	0
D	T.Ph. 0,5 M pH 7,5	I/5	4	I

2°- Utilisation du charbon végétal.

Parallèlement aux essais réalisés pour éliminer l'inhibiteur existant dans les extraits de melon, nous avons essayé pour les extraits d'artichaut, différentes doses de charbon végétal.

Matériel et méthodes :

a)- Préparation de l'inoculum : Les artichauts d'origine Tunisienne (Tn3) ont été utilisés pour cet essai. L'extrait obtenu dans les conditions optimum définies par l'expérience précédente, a été partagé en cinq parties égales, et additionné de quantités croissantes de charbon.

b)- Traitements : A : Témoin sans charbon
B : 50 mg. de charbon par ml.
C : 100 mg. de charbon par ml.
D : I50 mg. de charbon par ml.
E : 250 mg. de charbon par ml.

Le charbon utilisé est du charbon végétal RP pour analyse (Prolabo).

c)- Dispositif expérimental: le même dispositif que celui indiqué au paragraphe précédent a été utilisé, avec cinq feuilles utilisées, soigneusement choisies, sur cinq plantes au lieu de quatre.

TABLEAU II

Traitement	Quantité de charbon	Nombre total de lésions	Nombre de lésions par feuille.
A	O	24I	48
B	50mg/ml	845	I69
C	100mg/ml	I324	265
D	I50mg/ml	I503	30I
E	200mg/ml	I5I9	304

Résultats :

Les résultats consignés dans le tableau II montrent que l'addition de charbon augemente de façon considérable le nombre de lésions locales sur les feuilles de C.amaranticolor. Avec I50mg.de charbon on multiplie par 6,2 le nombre de lésions; avec 50mg, le nombre de lésions est déjà 3,5 fois plus grand. La photo p. illustre bien l'effet de doses croissantes de charbon sur l'augmentation du nombre de lésions locales obtenues à partir d'un même extrait.

L'augmentation du nombre de lésions correspondant à l'adjonction d'une quantité donnée de charbon (50mg/ml) est surtout sensible pour les faibles concentrations. A partir de I50mg/ml, le nombre de lésions n'augmente plus sensiblement.

Ces résultats semblent confirmer notre hypothèse de la présence d'un inhibiteur d'installation dans les extraits de feuilles d'artichaut.

.III. ESSAIS DE GUERISON PAR THERMOTHERAPIE.

Deux séries de 20 oeilletons, appartenant à 5 clones de Violet de Provence, ont été placés dans une case destinée au traitement des fraisiers par la chaleur, où la température est maintenue entre 37° et 40°.

Le premier test a duré un mois et demi. Quatre plantes du clône VP.260 ont survécu. Elles ont été indexées un mois plus tard, elles se sont révélées encore infectées.

Le second test a duré deux mois. Deux plantes seulement ont survécu, appartenant toutes deux au clône VP.53. Là encore, la tentative de guérison s'est révélée infructueuse.

.IV. CONCLUSION.

L'étude du virus latent mis en évidence dans les populations d'artichaut Violet de Provence et Blanc Hyérois, cultivés dans le Midi de la France, et en Afrique du Nord permettra peut-être d'éclairer certains aspects du phénomène de "dégénérescence" chez l'artichaut. La présence d'un virus latent affaiblit la plante et l'expose à un dépérissement rapide si elle est contaminée par un autre agent infectieux. Il n'est pas interdit de penser que le virus latent lui-même, peut dans certaines conditions, se multiplier à un taux plus élevé et devenir dommageable pour la plante.

Les améliorations apportées aux méthodes d'extraction du virus et d'inoculation mécanique, faciliteront l'indexage des souches et permettront la création de clônes indemnes de virus, s'il est possible, par ailleurs, de mettre au point une méthode de guérison, soit par thermothérapie, soit par culture de méristèmes.

Des travaux sont en cours pour isoler et identifier l'agent infectieux ainsi décelé.

* *
*

BIBLIOGRAPHIE.

1. Roberto GIGANTE. I949, Il mosaico del carciofo. BOL.STA.PATH.VEG.ROMA, pp.I77.I8I.

2. A.S.COSTA & al. I959. A latent virus of California Artichokes. PHYTOPATHOLOGY.49.I.pp.49.53.

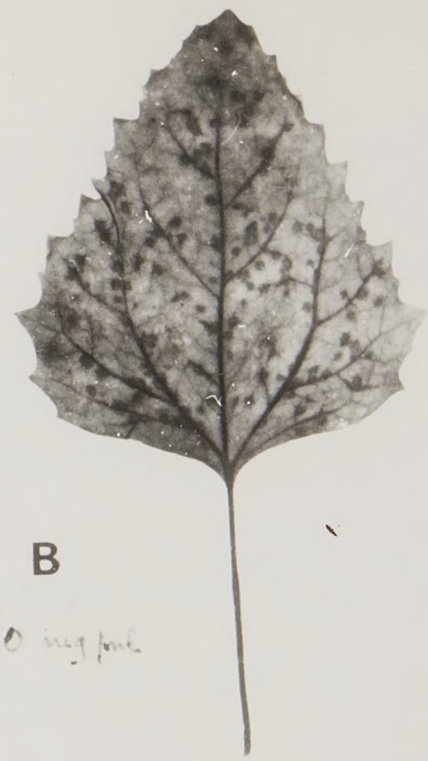
3. Donald J.MORTON. I96I. Host range and properties of the globe Artichoke curly dwarf. PHYTOPATHOLOGY.5I.IO.pp.73I.734.

1

2

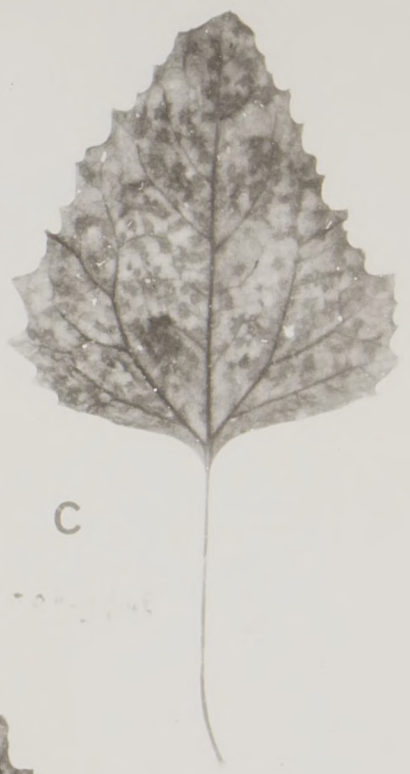
A

0

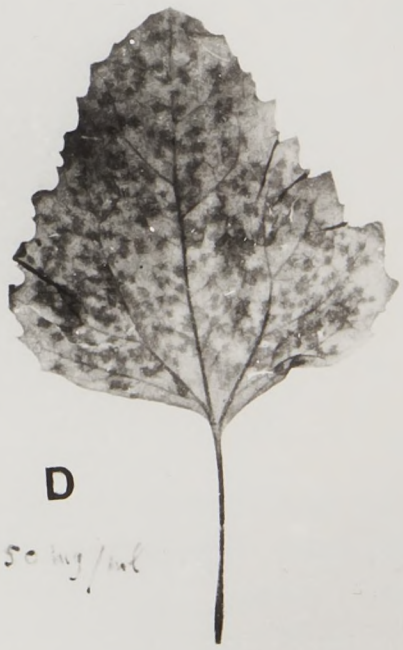


B

50 mg/ml



C



D

150 mg/ml

E

300 mg/ml

3

N° 5 - 1964.

MARROU(J). (1 - 2)

POCHARD(E) - MEHANI(S) - MARROU (J.) (3)

ESSAI DE PRODUCTION DE GRAINES DE LAITUE SANS VIRUS

-:-:-:-:-:-:-:-:-

J.MARROU (C.R.A.S.E. Montfavet)

M.TRAPATEAU (C.T.I.F.L. Bellegarde)

Nous avons présenté dans la Virologie Appliquée de 1962 un projet de sélection sanitaire des porte-graines de laitue. La mise en pratique des méthodes proposées a été possible grâce au concours du CTIFL et de la SARV.

Nous remercions les dirigeants de ces organismes qui ont bien voulu s'intéresser à ce travail et nous donner les moyens de le réaliser.

Les ingénieurs et les techniciens de la SARV et du CTIFL ont largement contribué à la réussite de ces essais.

C'est en leur nom à tous que nous présentons ce compte-rendu.

* *
*

La sélection sanitaire comporte trois opérations que nous étudierons successivement : le choix de laitues indemnes de virus, leur culture à l'abri des contaminations, jusqu'à l'obtention d'un volume suffisant de semences (deux années), le contrôle de l'absence de virus.

A. CHOIX DE LAITUES INDEMNES DE VIRUS.

En I962, des lots de graines des variétés Trocadéro à graines noires et Lilloise ont été acquis chez un sélectionneur réputé et cultivées 46 jours, à Versailles, en serres protégées des pucerons (grillage à maille fine, fumigations insecticides hebdomadaires), et éclairées par des tubes fluorescents pour prolonger à 18 heures la durée du jour.

Les taux d'épuration sont donnés par le tableau suivant :

TABLEAU I

Choix de laitue indemne de virus; Taux d'épuration			
Variétés	Nb.de plantes observées	Nb.de plantes malades	Taux d'épuration
Trocadéro (graine noire	647	I7	2,6%
Lilloise	529	9	I,7%

L'apparition des symptômes est plus rapide pour la variété Trocadéro que pour la variété Lilloise. Elle est progressive dans les deux cas, six épurations du I7ème au 34ème jour après le semis, ont été nécessaires pour éliminer les plantes malades (Tableau II). Aucune laitue malade n'est apparue ensuite jusqu'à la montée à graine; l'épuration a donc été efficace.

TABLEAU II

Apparition progressive des Symptômes			
Variété	Nb.de jours après le semis	Nb.de plantes épurées	Proport.par rapport au total
Trocadéro gr. noire	I7	9	52,9%
Lilloise		0	0%
Trocadéro gr n.	20	9 + 4	76,4%
Lilloise		3	33,3%
Trocadéro gr.n.	24	I3 + 3	94%
Lilloise		3 + 2	55,5%
Trocadéro gr.n.	27	I6 + 0	94%
Lilloise		5 + 0	55,5%
Trocadéro gr.n.	30	I6 + I	I00%
Lilloise		5 + 3	88,8%
Trocadéro gr.n.	34	I7 + 0 = I7	I00%
Lilloise		8 + I = 9	I00%

I963. Variétés Trocadéro et Lilloise. Dans les cultures sous abri grillagé les porte-graines les plus vigoureux et les plus conformes aux normes de la variété ont été piquetés au cours de l'été I962 et récoltés individuellement. Leurs graines ont été utilisées pour créer des lignées. Aucune plante virosée n'a été détectée dans leur descendance. Une lignée de Lilloise et trois lignées de Trocadéro ont été cultivées.

Variété Gloire de Nantes et Lilloise nouvelle série. Une Une sélection de Gloire de Nantes a été lancée au printemps I963 à partir d'un lot du commerce. Il n'a pas été trouvé de malade sur 250 observées.

A l'automne à Montfavet, la sélection de la Lilloise a été reprise sur un nouveau lot. Les symptômes sont apparus progressivement; les premiers ont été détectés au stade deux vraies feuilles. Dès le 23ème jour après le semis, 92,3% des plantes malades étaient épurées.

B. CULTURE A L'ABRI DES CONTAMINATIONS

Les laitues sans virus doivent être cultivées à l'abri des pucerons vecteurs de virus. La première année, elles sont placées dans des abris grillagés, comparables à ceux utilisés pour la sélection sanitaire du fraisier. Les graines récoltées dans ces conditions sont utilisées, après contrôle, pour l'ensemencement de parcelles isolées géographiquement de toute source de contamination. Nous envisagerons successivement les deux types de culture.

1- Culture sous abri grillagé :

En I962, nous disposions d'un abri de 40m2 à Versailles et deux abris de 24 m2 à Montfavet. Ces abris ont été mis à notre disposition par le CTIFL. La densité de plantation (40cm. x 30 cm) était beaucoup trop élevée et a favorisé le développement du Botrytis au stade pomme. 60 à 75% seulement des porte-graines sont arrivé à maturité. Aucune plante n'a présenté de symptôme de mosaïque chez Trocadéro. Trois plantes douteuses ont été éliminées, après la montée à graine, dans la culture de Lilloise. Cette dernière donne de très mauvais résultats en culture estivale. Elle souffre de la chaleur et devient très sensible à toutes les affections parasitaires.

Le tableau III résume les résultats obtenus dans les différentes cultures.

TABLEAU III

Culture sous abri grillagé en I962

Lieu	Variété	Poids total de la récolte	Nb. de porte-graines	Récolte moyenne par pied
AVIGNON				
cage 1	Trocadéro	I20I,5gr	I30	9,24
cage II	Trocadéro	407,5 -	58	7,02
cage II	Lilloise	689,5 -	55	I2,5
VERSAILLES				
cage I	Trocadéro	I3I5,7 -	98	I3,4
cage II	Trocadéro	689,5 -	-	-

En I963, toutes les cultures ont été réalisées à Montfavet sous 80m2 d'abri grillagé :

- 50 m2 pour les trois lignées de Trocadéro
- I2 m2 pour Lilloise
- I2 m2 pour Gloire de Nantes.

La variété Lilloise a été éliminée après un mois de culculture, du fait de la faible vigueur des plantes et des anomalies constatées. La sélection sanitaire de cette variété a été reprise à l'automne. Une cage de 40 m2 est en culture.

Le tableau IV résume les résultats obtenus pour les variétés Trocadéro et Gloire de Nantes. Aucune plante n'a été contaminée par le virus de la Mosaïque.

TABLEAU IV.

	Nb. plantes	Nombre récolté	Mortalité Botrytis	Récolte totale	Moyenne par plante
TROCADERO					
Ligne T86	100	76	24%	5I7 gr	6,6
T 8I	100	53	47%	268 gr.	5
T II5	I20	IOI	I6%	752 gr.	7,4
GLOIRE DE NANTES					
sélection massale	72	56	22,3%	330 gr	5,9

Les cages dont nous disposions en I962 et I963 ont parfaitement protégé les cultures. Il n'a pas été noté de recontamination sur Trocadéro, bien que les laitues cultivées en plein air à proximité aient été très rapidement virosées (zône maraîchère d'Avignon).

La mortalité non négligeable (I6 à 24%) en moyenne) est due aux attaques tardives sur pomme du Botrytis cinerea. Ce champignon provoque la pourriture molle des feuilles internes de la pomme et des chancres nécrotiques sur la base de la hampe florale. Des traitements au TMTD par poudrage n'ont pas permis d'arrêter le développement de la maladie. Il est difficile de faire pénétrer le produit au niveau du foyer de contamination, celui-ci est protégé par les feuilles externes très enveloppantes de la pomme.

Comme l'avait déjà signalé LOUVET, il semble que la désinfection du sol à la vapeur élimine efficacement le Sclerotinia, mais ne semble pas avoir d'effet sur le Botrytis. Cette année, le sol des abris grillagés sera désinfecté à la vapeur et au PCNB.

Des essais, en collaboration avec Mr.CM.MESSIAEN sont en cours pour déterminer les produits fongicides les plus actifs contre Botrytis cinerea et établir un calendrier de traitement.

La densité de plantation sera réduite (distance de plantation 40x50) pour permettre une aération et un séchage plus rapide du sol et des feuilles.

L'incision de la pomme sera généralisée à toutes les cultures pour faciliter la sortie de la hampe florale et écourter la période critique qui précède ce stade de végétation.

Des essais de traitement à l'acide gibberellique sont envisagés après le succès obtenu par Mr.DOMERGUES et Mlle PHILOUZE sur la variété Merveille des Quatre-saisons; Cette méthode présente l'inconvénient de faire disparaître le stade pomme, période cependant favorable au contrôle de l'homogénéité variétale.

Ces mesures devraient permettre de maintenir et même d'élever le rendement de graines à l'unité de surface couverte. Les rendements ont été de 42 à 52 gr. au m2 pour la variété Trocadéro à graine noire. (voir tableau V).

TABLEAU V.

	Rendement au m2 I962 I963
Trocadéro G.N. I962	50 gr.
Lilloise I962	57 gr.
Trocadéro G.N. I963	42,3 gr.
Gloire de Nantes I963	27 gr.

2 - Culture en plein champ.

Si la production de graines de laitue sans virus sous abris grillagé ne pose plus de problème, du point de vue du virologue, la culture en plein champ reste par contre pleine d'aléas. L'isolement géographique préconisé par GROGAN (20 km. de toutes cultures de laitues) est difficile à réaliser en France. Les maisons de sélection hésitent à éloigner leurs cultures des zônes traditionnelles de production grainière du fait des risques que comportent la recherche de nouveaux terrains favorables et la formation technique de cultivateurs non initiés.

Les essais mis en place avec le concours de la SARV et du CTIFL avaient pour bût :

- de rechercher de nouvelles zônes de cultures à la fois favorables à la production de semence et à la sélection sanitaire.

- de déterminer les distances minimum pour isoler efficacement une culture sans virus de cultures non contrôlées.

- d'acquérir une expérience personnelle de la production grainière et du contrôle de l'état sanitaire, afin de pouvoir conseiller utilement les sélectionneurs, et de former, le cas échéant, des contrôleurs ou des conseillers techniques spécialisés.

a) Dispositif expérimental :

Forme et taille des parcelles : pour des raisons pratiques et économiques, la surface des parcelles a été limitée à 10 ares. La forme carrée a été retenue, pour diminuer le plus possible l'importance des bordures toujours plus exposées aux attaques parasitaires.

Le sol est désinfecté par traitement au PCNB (8gr. de m.a/m2). Les distances de plantation étaient de 60 cm. entre les rangs.

Les semis ont été faits en place à la main ou au semoir. Cette technique nous a semblé préférable car les risques de contamination en pépinières sont très graves du fait de la concentration sur une faible surface d'une population de plantes considérable. Chez des producteurs non spécialisés en cultures maraîchères ou grainières, cette méthode est préférable aux cultures repiquées. Dix grammes de graines à l'are ont été utilisés. Les laitues ont été éclaircies 40 à 60 jours après le semis, en laissant une plante tous les 25 cm environ.

b) Mesures prophylactiques appliquées.

1- Traitements aphicides. Les parcelles ont été ensemencées avec des graines poudrées avec de l'Azidithion (Sayfos 80) le produit pénètre dans les jeunes plantules au moment de la germination et les protège des pucerons pendant plusieurs semaines. Dans un essai préliminaire en serre, ce produit à la dose de 60 mg. par gramme de semence, nous a donné de très bons résultats : protection : 50 jours.

Des traitements à l'Isolan (0,15% de spécialité commerciale) ont été répétées tous les 10 jours à partir du stade 3 ou 4 feuilles) Cet insecticide nous avait donné de très bons résultats dans un essai antérieur (MARROU 1961).

2- Ecrans. Dans plusieurs essais, des écrans ont été mis en place pour limiter les déplacements des pucerons. Les travaux de BONNEMAISON sur porte-graines de betterave, de BROADBENT sur choux et de PELET sur laitue, ont montré l'intêret de cette technique culturale. Nous avons utilisé les écrans suivants :

BLE : semer une bande de blé de 10 à 20 cm. de large. Densité 50 grains au mètre (3 gr.)

LIN : semer deux rangs à 10 cm. l'un de l'autre. Densité 350 grains au mètre (2 gr. au mètre).

ECRAN MIXTE : 1 rang de blé semé dru, 1,5gr. au mètre et 1 rang de Lin (2 gr. au mètre).

Ces écrans, placés tous les 3,6 mètres protégeaient 5 rangs de laitue.

Dans les essais de Bellegarde, ces essais étaient complétés par des brise-vent constitués par deux rangs de maïs INRA 258 semés à 10 cm. l'un de l'autre, et placés tous les 10 mètres.

Les écrans et les brise-vent ont été semés en même tomps que les laitues. Leur vitesse de croissance est supérieure à celle des laitues.

c) Contrôles.

Tous les 10 jours, un ingénieur ou un technicien de la SARV

ou du CTIFL a procédé à un contrôle, plante par plante, de l'état sanitaire de la culture. La population aphidienne de chaque parcelle de 1000 m2 a été estimée par un comptage feuille par feuille de 100 plantes réparties au hasard dans la culture.

Des fiches de contrôle, comportant un plan de la parcelle, ont permis de suivre l'évolution de la culture. Les renseignements recueillis ont été condensé dans les tableaux VI et VII.

d) Résultats.

Les essais de Bellegarde, du Pègue et St-Mathurin ont été récoltés dans de bonnes conditions.

Ceux de Pellautier, Prigonrieux, Souvigny ont été contrôlés jusqu'à la fructification, mais la récolte a été anéantie par le Botrytis cinerea. Ces trois essais ont été mis en place tardivement et l'été pluvieux n'a pas permis de rattraper le retard. Les notations en culture n'ont pu être complétées par l'analyse du taux de transmission.

1- Isolement.

L'isolement en altitude semble être intéressant. Les premiers pucerons apparaissent plus tard qu'en plaine et nous n'avons pas noté de pullulations importantes. L'essai du Pègue planté précocement a donné de très bons résultats tant sur le plan agronomique que sur le plan sanitaire. L'essai de Pellautier, à 1000 mètres aurait été aussi productif si la moisissure des inflorescences n'avait anéanti la récolte à fin Septembre. Des essais seront repris dans cette région, avec une plantation précoce de jeunes plantes élevées sous chassis. Cette technique culturale devrait permettre l'exploitation des avantages indéniables de l'isolement en altitude. Il semble cependant que seules les régions méridionales : Alpes et Pré-Alpes du Sud, offrent un été suffisemment chaud et sec pour permettre la maturation des graines. Cette culture spécialisée et lucrative présenterait pour ces régions deshéritées un avantage économique appréciable.

Des raisons techniques et économiques comparables avaient orienté notre essai de Souvigny-en-Sologne. Le Botrytis, plus précocement encore qu'à Pellautier, a anéanti la récolte, à la fin de la floraison.

Malgré l'isolement géographique, la Mosaïque de la laitue a fait une apparition tardive mais réelle dans la culture. La mauvaise végétation, les carences observées en début de culture ont-elles masquées les symptômes des rares laitues contaminées dès la graine ? Les pucerons dénombrés du 11 Juillet au 24 Août, ont-ils apporté le virus? Il ne nous est pas possible de répondre à ces questions. Des essais seront

TABLEAU VI

Description des parcelles d'essais

Situation	Alt.	Isolement géographique	Isolement local	Ecran	Surface des essais Responsable
BELLEGARDE Costiere du Gard.	52,3	Région de mise en valeur récente (Bas-Rhône Languedoc) cultures de laitues d'hiver dans les fermes maraîchères voisines	Isolement relatif par de cultures de laitue dans un rayon de 1000m. (excepté jardins potagers)	B.Vent : Maïs. Ecrans : Blé Lin Blé & Lin	5000 m2 C.T.I.F.L (Mr.TRAPATEAU)
LE PEGUE Drôme	360	Très bon, à 6km. de Valréas, centre agricole non spécialisé en cultures légumières. Isolement à 1 km. de tout village	Ferme isolée. La plus proche à 400m. et séparée par une colline de 383m. Traitement préalable des cultures grainières de choux risquant d'héberger des pucerons.	-	1000 m2 S.A.R.V. Bureau d'Avignon (MMrs.BRUN & VERGNIAUD)
PELLAUTIER (Htes-Alpes)	930	Très bon. Relief tourmenté séparant la ferme du village (1400m.à vol d'oiseau) Pas de cultures légumières	Ferme isolée. Parcelle contigue à une pépinière traitée au Metasystemox et entourée sur les 3 autres côtés par un champ de blé.	-	1000 m2 S.A.R.V (Bureau d'Avignon)MMrs BRUN ET VERGNIAUD) D.S.A.des Htes-Alpes (Mr.TRON)
PRIGONRIEUX (Dordogne)	25	Région de polyculture non spécialisée en culture maraîchère	Pépinières et vergers traités aux aphicides : pas d'habitations dans un rayon de 250m.	Lin Blé Blé Lin	3000m2 C.T.I.F.L (MMrs LABERGERE & FUERTE)
SAINT MATHURIN Maine & Loire	15	Région de production grainière et de culture maraîchère .	Culture de laitues port-graines à l'Est à l'Ouest dans un rayon de 250m.Très bien isolée par culture de Maïs et de Blé et Chanvre.	Blé	1000m2 S.A.R.V. Bureau d'Angers. Mr.CHAVAGNAT
SOUVIGNY EN SOLOGNE (Loir & Cher)	144	Théoriquement parfait. Clairière dans unevaste forêt. Pas de culture légumière. Village à 2km. à vol d'oiseau	Pas de ferme dans un rayon de 800m.	Lin Avoine Lin Avoine	4000m2 S.A.R.V. Bureau de Versailles (Mr.PEYRIERES)

TABLEAU VII

Résumé des contrôles exercés dans les différentes parcelles
(les dates sont suivies du nombre de jours écoulés depuis le semis)

		SEMIS	Ier Vol de pucerons	Vols massifs	Stade de végétation	Premiers symptômes		Proportion d'épuration
						Date	stade	
Bellegarde	Trocadéro graine noire	30/4 0	5/6 38	I3/6 45	pré-pomme	30/7 92	montée à graine	6,5 p.mille
LE Pègue	Trocadéro graine noire	28/3 0	6/6 72	pas	pré-pomme	0	-	0
Pellautier	Trocadéro graine noire	29/4 0	IO/7 73	pas	pomme	0	-	0
Prigonrieux	White Boston (Attraction)	4/4 0	I/6 58	20/6 78	pré-pomme	3/8 122	montée à graine	3,2 p.mille
Saint-Mathurin	Trocadéro	3/4 0	I5/5 44	20/6 8I	début montée	0	-	0
Souvigny	White Boston	I7/5 0	II/7 56	29/7 74	pomme	I6/9	montée à graine	2,1 pour mille

repris cet été avec des lots absolument indemnes de virus et dans de meilleurs conditions de culture (semis en pépinières, repiquage début mai). Les graines utilisées cette année provenaient des Etats-Unis, leur taux de transmission était garanti inférieur à 0,05%.

Un isolement local bien étudié semble être également efficace comme le montre les résultats obtenus à Saint-Mathurin, dans la vallée de la Loire.

Il y avait des cultures de laitue, non épurées, à 250 mètres à l'Est et à l'Ouest de la parcelle. De vastes champs de Maïs, de Chanvre et de Blé séparaient ces cultures des nôtres. Dans la Vallée du Rhône, nous avons également constaté que des champs de porte-graines restaient sains à proximité relative (300 m.) de champs infestés par la Mosaïque, mais séparés d'eux, par des cultures immunes au virus.

Ces résultats encourageants ne doivent pas faire sous estimer les difficultés rencontrées pour cultiver, à l'abri des pucerons vecteurs, du virus, des parcelles importantes de porte-graines.

2- Date de semis.

L'age auquel la laitue est contaminée par le virus a une très grande importance en sélection sanitaire. Les contaminations précoces, au stade rosette, sont généralement décelables rapidement (12 à 20 jours). L'épuration intervient avant que la maladie ait pu se répandre. Les contaminations tardives, juste avant la formation de la pomme, du 50ème au 70ème jour sont au contraire, très gênantes. A ce stade, il y a masquage des symptômes. Des foyers de maladie, invisibles existent dans le champ. Les pucerons disséminent le virus de ces plantes, aux laitues voisines. A la montée à graine, lorsque les bractées sont bien étalées, les symptômes apparaissent à nouveau. L'épuration à ce stade est presque inopérante, trop de laitues ont été contaminées. Les plantes voisines sont généralement virosées mais l'incubation n'étant pas terminée, elles échappent aux contrôles et servent à leur tour, de source de virus.

A Prigonrieux, par exemple, alors que le reste du champ était sain, une zône entre deux écrans était particulièrement contaminée à la fin du mois d'Août. Dans cet essai, les populations de pucerons les plus importantes avaient été remarquées le 20 Juin, alors que les laitues étaient au stade pré-pomme. La vague de contamination semble avoir été endiguée par les écrans de blé. Ceux-ci limitent la dissémination d'un bout à l'autre du champ. A Souvigny, la parcelle sans écran a toujours été légèrement plus contaminée par les pucerons. Ces remarques nous ont engagé à refaire des essais systématiques d'écrans (Balandran 1964).

Les semis hâtifs permettent aux laitues d'atteindre le stade hampe florale au moment des vols importants de pucerons. (I5 Février en plaine, 1er Juillet en altitude). A ce stade les symptômes sont nets et l'épuration conserve son efficacité. D'après H.B.COUCH, les contaminations tardives n'ont plus d'influence sur l'état sanitaire des semences. Pour vérifier cette observation, dans les conditions de culture normale, et sur une variété française (Trocadéro) des essais de contamination artificielle seront réalisés cet été de 10 en 10 jours.

Pour faciliter les plantations hâtives des cultures repiquées seront expérimentées. Pour limiter les inconvénients qui nous avaient fait renoncer à cette technique culturale en I963) les pépinières seront établies sous des chassis protégés des pucerons par des toiles à mailles fines.

3- Effet du Botrytis cinerea.

Outre les pertes importantes dues à la pourriture des pommes ou des hampes florales, le Botrytis gêne considérablement la sélection sanitaire par les symptômes qu'il induit à distance sur les bractées. Bien qu'il ne soit pas possible d'isoler le parasite à ce niveau, les feuilles de la hampe ont un aspect anormal : crispation du limbe, décoloration, puis rougissement et nécrose par plages irrégulières. Ces symptômes masquent ceux de la Mosaïque et rendent à peu près impossible l'épuration. Cet inconvénient explique que nous ayons laissé échapper des laitues malades dans les parcelles d'essai de Bellegarde, contaminées tardivement par le virus et fortement attaquées par le Botrytis.

C- CONTRÔLE.

Le contrôle de l'état sanitaire des lots de semence produits sous cage grillagée et en plein champ a été réalisée par culture témoin en serre protégée des insectes.

- Méthodes de culture.

Un gramme et demi de graines constituant l'échantillon à analyser, est semé en terrine. La germination a lieu en 48 heures pour la variété Trocadéro qui ne présente pas de dormance. Les jeunes plantules sont élevées pendant une semaine puis repiquées au stade cotylédon, bien développé, 64 par terrine carrée de fibro-ciment de 30x30.

A Versailles, l'éclairage d'appoint par tubes fluorescents ou lampes à vapeur de mercure (I500 à 2000 lux/m2), était absolument indispensable du I5 Octobre au I5 Mars. A Montfavet, la luminosité du ciel et des serres permet une végétation normale sans lumière d'appoint. Seules les terrines de semis étaient placées en jour long.

Le repiquage permet d'obtenir des lots très homogènes et non étiolés. Un ouvrier exercé peut facilement préparer les mélanges terreux et repiquer 1000 à 1500 plantules par jour. Un chantier organisé permettrait d'augmenter le rendement de chaque ouvrier dans de larges proportions.

Mélange terreux. Nous avons utilisé différents mélanges terreux, désinfectés à la vapeur. Ceux qui permettent la meilleure croissance des laitues sont les plus favorables. Plus la végétation est active, plus la différence entre plantes saines et malades est facile à établir.

Echantillonage.

1) Graines récoltées sous abris grillagés. Nous avons tenu à vérifier l'absence totale de virus dans les lots de semence produits sous abri grillagé. En sélection massale, les porte-graines sont récoltés et battus séparément. Un échantillon de 500 mg. est prélevé dans la récolte de chaque porte-graine. Les échantillons de 3 à 5 plantes sont groupés et font l'objet d'une culture témoin, de 1000 plantes au moins (en 1962-63, 350 plantes seulement ont été obtenues.). Les lots reconnus sains sont ensuite mélangés entre eux. Les plantes d'une même lignée sont récoltées en mélange, après avoir mis de côté les porte-graines Super-Elite, destinés à la poursuite de la sélection. Le tableau VIII résume les observations faites sur les graines provenant des cultures 1963. Ce travail a été réalisé avec la collaboration de MMrs.FUERTE (1962) et TRAPATEAU (1963à agents techniques du C.T.I.F.L en stage dans notre laboratoire.

2) Graines récoltées en plein champ. Pour chaque parcelle de 10 ares, une culture témoin de 5000 plantes a été réalisée. Lorsque ce premier contrôle n'avait pas mis en évidence de plantes malades, une seconde culture était semée pour confirmer ce résultat. Les contrôles portaient alors sur 10 à 12000 plantules. Le tableau IX rend compte de ce travail.

Nombre de plantules à observer. Le contrôle des essais de Bellegarde souligne l'importance des cultures témoins sur des populations importantes de laitue. Cinq fois 1000 plantules ont été observées pour chaque lot. Si le contrôle s'était basé sur une seule de ces répétitions, dans chaque cas, il y aurait une chance sur 5 pour que le lot soit considéré comme sans virus, alors que son taux réel varie, selon les lots de 0,6 à 0,24%.

Le contrôle de 3000 plantules est nécessaire, d'après TUCKER FROTER pour détecter avec certitude (99,9%) qu'un lot renferme moins d'une graine malade pour 1000. Ces résultats ont été vérifiés dans nos essais. Ainsi dans le contrôle des lots C, dont le taux de transmission calculé sur 5000 plantules était de 0,24%, il y avait 2 chances sur 5 de laisser passer le lot comme sans virus (tolérance 1/1000), sur un échantillon de 1000, 2 chances sur 10,

TABLEAU VIII

Contrôle Super-Elite (abri grillagé) I963

Variété	Lignée	Nb. de plantes composant la lignée ou le lot	Poids du lot en gr.	Nb. de plantes observées	Résultats
Trocadéro graine noire	T.II5 I	5I	4I4	3300	sans virus
- -	T.II5 II	50	326	4000	sans virus
- -	T.86	76	5I7	4000	sans virus
- -	T.8I	53	268	3000	sans virus
Gloire de Nantes	massale	56 / 9	346	1000x9	en cours

TABLEAU IX

Contrôle des lots Elite (Culture en plein champ)

Origine	Poids du lot	Nb. de plantes observées	Nb. de plantes malades	taux de transmission
BELLEGARDE				
Parcelle A	20 Kg.	5000	11	0,22%
B	55 Kg.	5000	7	0,I4%
C	30 Kg.	5000	12	0,24%
D	45 Kg.	5000	3	0,06%
LE PEGUE	95 KG.	I2.000	0	0
ST-MATHURIN	42,5 Kg.	6000	0	0
		6000 (en cours)		

avec un échantillonnage de 2000, aucun risque d'erreur ne subsiste lorsque l'on observe 3000 plantules.

Durée des cultures témoin. Toutes les cultures témoin réalisées pour contrôler les lots de semences produites dans nos essais ont duré au maximum 30 jours, du semis à l'arrachage. Six contrôles du stade 1 vraie feuille au stade 5 à 6 feuilles (arrachage) permettent de détecter toutes les laitues contaminées dès la graine.

Lorsque la végétation est rapide, les symptômes apparaissent pour la variété Trocadéro sur la première ou la seconde feuille. Si les conditions de culture sont moins favorables (jours courts) les symptômes ne sont nets que sur la 3ème ou 4ème vraie feuille.

Nos observations confirment celle de Miss ROLOFF, toutes les laitues virosées dès la graine sont repérées avant la formation de la 6ème feuille.

Cas douteux : on rencontre parfois dans les terrines de contrôle des plantules présentant des anomalies morphologiques qui ne sont pas caractéristiques de la Mosaïque, mais laissent planer un doute sur l'état sanitaire de la plante. Chaque fois qu'un tel cas se présente, nous inoculons l'extrait obtenu en broyant la plantule dans 1 volume de Tampon (O,OI M. pH 7 + DETC M/I3) à 2 à 3 plantes de Chenopodium quinoa. Cette plante réagit sélectivement en I2 à 25 jours au virus de la Mosaïque en donnant des lésions locales sur les feuilles inoculées et une Mosaïque aucuba sur les jeunes feuilles. Ce test permet de confirmer ou d'infirmer le diagnostic visuel.

Conclusion : Le contrôle par culture témoin permet de calculer avec précision le taux réel de transmission par graine. Les cultures sont possibles en serre, nos essais l'ont prouvé, mais leur prix de revient est élevé. L'utilisation de chambres climatisées, comparables à celle mise au point par Miss ROHLOFF est conseillées par ISTA permettront sans doute d'accélérer les contrôles. Des essais seront entrepris dès que nos chambres climatisées seront en fonctionnement.

En collaboration avec Mr. BANNEROT, l'analyse statistique des résultats acquis en I963 permettra de définir d'une part le nombre d'échantillons à prélever par lot de semence en fonction de son volume, et le nombre de plantules à considérer pour calculer le taux de transmission avec le maximum de précision sur le minimum de plantes.

Parallèlement à ces recherches, nous avons expérimenté avec succès le test sur germination imaginé par F. PELET, Moins précise que la culture témoin, cette culture permet de trier à peu de frais les lots fortement contaminés des lots sains. Une série de tests est en cours pour vérifier la sensibilité de la méthode sur des lots présentant une faible proportion de graines virosées.

-CONCLUSION GENERALE.

La sélection sanitaire de porte-graines sans virus et la production de graine de laitue à faible taux de transmission, moins de 1 pour mille, semble parfaitement possible. Certaines maisons de sélection ont obtenu de très bons résultats avec des méthodes de sélection comparables.

Le Centre Technique interprofessionnel des fruits et légumes a bien voulu se charger d'entretenir sous abris grillagés, des lignées de laitues indemnes de virus. Les sélectionneurs qui en feront la demande pourront obtenir de telles semences. Grâce à cette organisation, tous les producteurs de graines pourront appliquer la sélection sanitaire à leurs cultures. La généralisation de cette sélection permettra de réduire dans de fortes proportions les pertes provoquées par le virus de la Mosaïque de la laitue.

La création d'un label sans virus donnerait une garantie aux utilisateurs, faciliterait l'exportation des graines de laitue française et consacrerait officiellement les résultats obtenus par les maisons de sélection. Le GNIS étudie avec le concours de l'INRA et des producteurs de graines, l'oportunité de la création d'un tel label et ses modalités d'obtention.

* *
*

QUELQUES ESSAIS ET OBSERVATIONS CONCERNANT L'EPIDEMIOLOGIE DE MALADIES A VIRUS DE TYPE JAUNISSE SUR TOMATE. RECHERCHE DE VECTEURS POSSIBLES.

M.T. COUSIN (Mme), J.P. MOREAU, J. ROUGIER
Station Centrale de Pathologie Végétale
Station Centrale de Zoologie Agricole
VERSAILLES

C'est à la fin de l'été 1962, relativement chaud et ensoleillé, que, dans la région parisienne, on observait pour la première fois des atteintes de maladies à virus de type Jaunisse sur tomate. Si certains champs en restaient totalement exempts, d'autres étaient infectés à des taux avoisinant 50 %. Mais, comme les relevés ne furent effectués que tard en saison, les observations sur la répartition des plantes malades s'en trouvèrent très limitées. Il convenait donc, au cours de la période de végétation 1963, d'étudier comparativement l'évolution de la maladie et l'apparition de cicadelles réputées vectrices de ce groupe de viroses. C'est ce qui fut fait, d'une part dans un champ où l'on introduisit artificiellement quelques foyers d'infection, d'autre part dans un milieu infecté naturellement l'année précédente.

I - INTRODUCTION DE FOYERS DANS UN MILIEU APPAREMMENT INDEMME DE VIRUS.

Le 1er Juin 1963, 528 pieds de tomates "Marmande" furent repiqués en plein champ. L'ensemble de l'essai, mesurant 20 mètres sur 17 mètres fut divisé en 3 blocs de 2 parcelles chacun (Fig.1). Sur ces deux parcelles l'une sera binée régulièrement, l'autre H simplement fauchée, la présence d'herbe pouvant faciliter les déplacements des cicadelles. L'espacement était de 1 m entre les lignes et de 0,60 mètre entre les pieds le long de la ligne. Le champ se situait au voisinage de vergers herbeux ne recevant aucun traitement insecticide et probablement favorables au développement des vecteurs. Sur les tomates on pratiqua la suppression du premier bouquet, la taille à une seule tige et l'écimage à 4 bouquets. Seuls les traitements fongicides (MESSIAEN,1960) furent régulièrement appliqués, à l'exclusion de tout produit contre les insectes.

Le 10 juin, au centre de chaque parcelle, on inocula par greffage à un groupe de 6 plantes, les deux souches Nord et Sud isolées à la fin de l'été 1962 dans la région de Monthléry (S.&.O). L'observation régulière des foyers et des autres plantes nous fournit les résultats suivants :

.../...

L'apparition des symptômes sur les foyers souches Nord et Sud fut notée environ un mois après l'inoculation par greffage. Si les greffes ne réussirent pas en totalité, les symptômes apparurent néammoins sur chacun des 6 foyers.

[illegible] plus tard, quelques tomates non greffées montrèrent les premières caractéristiques de la maladie, et le nombre des pieds atteints augmenta au cours de l'été. En fin de saison, leur répartition était celle représentée sur le plan de la Fig. n°1 où chaque case correspond à une plante. Il est à noter que les symptômes étaient plutôt de type "Nord" et que leur intensité n'atteignit jamais celle des foyers. Sur 492 tomates non greffées :

300 ne présentèrent aucun signe de maladies à virus et ne figurent pas sur le plan.
119 montrèrent un léger enroulement foliaire et un faible accroissement de la pigmentation anthocyanique : 1
73 prirent un aspect buissonnant, érigé, accompagné d'enroulement foliaire et d'une teinte violacée intense du feuillage: 2

Ces résultats nous montrent que la dissémination de la maladie, vraisemblablement à partir des six foyers, a bien eu lieu et ceci d'une manière pratiquement au hasard. La présence d'insectes vecteurs semble donc fermement établie.

Ce n'est que peu de temps (46 jours) après l'introduction de foyers de plantes malades par greffage que les premiers symptômes apparurent sur les autres plantes. En admettant que l'infection ne préexistait pas dans le biotope, il semblerait que le vecteur ait pu acquérir le virus quelques jours seulement après le greffage.

Enfin, pour mesurer l'influence dépressive de la maladie sur le rendement en fruits, on récolta et pesa la production de chaque pied, au cours de 5 cueillettes successives. Les résultats des pesées en fonction des symptômes observés, sont portés dans le tableau ci-dessous

Intensité des symptômes	0	1	2	Foyers +
Nombre de plantes	300	119	73	36
Nombre de plantes en % de plantes non greffées	61 %	24 %	15 %	
Rendement (Kg par plante)	2,06	1,87	1,52	1,13
Baisse de rendement (en %)	-	9 %	26 %	45 %

+ Les rendements indiqués ici concernent l'ensemble des plantes greffées et ne présentent donc qu'une valeur relative ; lorsque les greffes réussirent le rendement fut pratiquement nul.

Pour l'analyse statistique de ces résultats, l'essai fut interpreté comme un split splot constitué de 3 blocs, chaque bloc étant subdivisé en 2 parcelles. On peut ainsi en déduire que :

- la variation due à l'effet bloc n'est pas significative.
- la variation due à la présence ou à l'absence d'herbe dans les parcelles est très significative: le rendement étant considérablement accru par le binage fréquent du sol.
- la variation due à l'infection est aussi très significative. Toutefois, du calcul de la plus petite différence significative, il découle que seules les plantes 2 [illegible] , non inoculées par greffage, présentent un rendement significativement différent des plantes n'ayant jamais manifesté de symptômes. Un faible pourcentage des Tomates (15 % seulement) présentèrent donc ure baisse de rendement appréciable.
- Enfin l'intéraction herbe-infection n'est pas significative. La présence d'herbe dans les parcelles ne semble donc pas avoir influencé la dissémination de la maladie. Toutefois les dimensions limitées de l'essai nous empêchent de tirer une conclusion définitive sur le rôle des adventices dans la transmission. On n'observa jamais les anomalies signalées par les auteurs étrangers sur Stellaria media et Convolvulus arvensis, adventices fréquentes dans le champ et à son voisinage.

II - OBSERVATION D'UNE INFECTION NATURELLE ET COMPARAISON AVEC LES RESULTATS OBTENUS PRECEDEMMENT.

Parallèlement à ces observations effectuées dans un milieu apparemment indemme de virus, nous avons noté l'évolution des symptômes de "Stolbur" dans un champ de tomates naturellement infecté l'été précédent. Lors d'une lère visite, le 22 mai (les plantes étant encore en châssis) on n'observait aucune plante infectée. Dès la seconde visite, le 27 Juin, on notait déjà la présence de plantes isolées présentant des symptômes accusés. On conçoit donc qu'il conviendrait de répéter ces observations au cours du mois de Juin afin de préciser la date d'apparition des premiers symptômes Si l'on tient compte de la période d'incubation du virus dans le plante les premiers symptômes correspondraient à une inoculation par le vecteur se situant fin mai-début juin et peut-être même courant mai.

III - DETECTION DE CERTAINES CICADELLES POUVANT JOUER LE ROLE DE VECTEURS.

Nos observations, sans négliger l'ensemble des insectes piqueurs présents dans les champs de tomates, ont porté principalement sur les Homoptères Auchenorrhynques déjà signalés comme vecteurs de viroses du type Jaunisse. (1) Les résultats des captures, faites tant à l'aspirateur qu'au filet, font l'objet du tableau n°3.

(1)- A ce sujet nous tenons à remercier Mr. J. d'AGUILAR, Maître de Recherche à la Station Centrale de Zoologie Agricole pour l'aide qu'il nous a apportée dans les déterminations.

Hyalesthes obsoletus, le premier vecteur reconnu en Tchécoslovaquie n'a été trouvé qu'à un seul exemplaire à Versailles. Il semble donc beaucoup moins répandu qu'Euscelis plebejus, Aphrodes bicinctus, et surtout Macrosteles sexnotatus et Calligypona pellucida.

Pour la plupart des espèces observées, la tomate ne constitue qu'un élément insuffisant et même défavorable, ne leur permettant, lorsqu'elles n'ont pas d'autre choix, qu'une survie plus ou moins longue. Notons cependant qu'Euscelidius variegatus, cicadelle récoltée en nombre important dans un champ fortement infesté (Orléans - fin Septembre 1963) effectue aisément deux mues larvaires sur tomate et y survit au moins 15 jours à l'état adulte. Les plantes hôtes préférées de la plupart de ces insectes sont généralement les graminées et légumineuses sauvages et cultivées. Seule Empoasca flavescens semble effectuer son cycle entier sur Tomate. Les chances pour que cette espèce soit vectrice du Stolbur sont assez faibles, mais par contre, son abondance pourrait provoquer des enroulements foliaires assez proches des symptômes du type 1. C'est ce qui a été observé dans la région de Montlhéry en particulier sur la variété St Pierre (tableau 2).

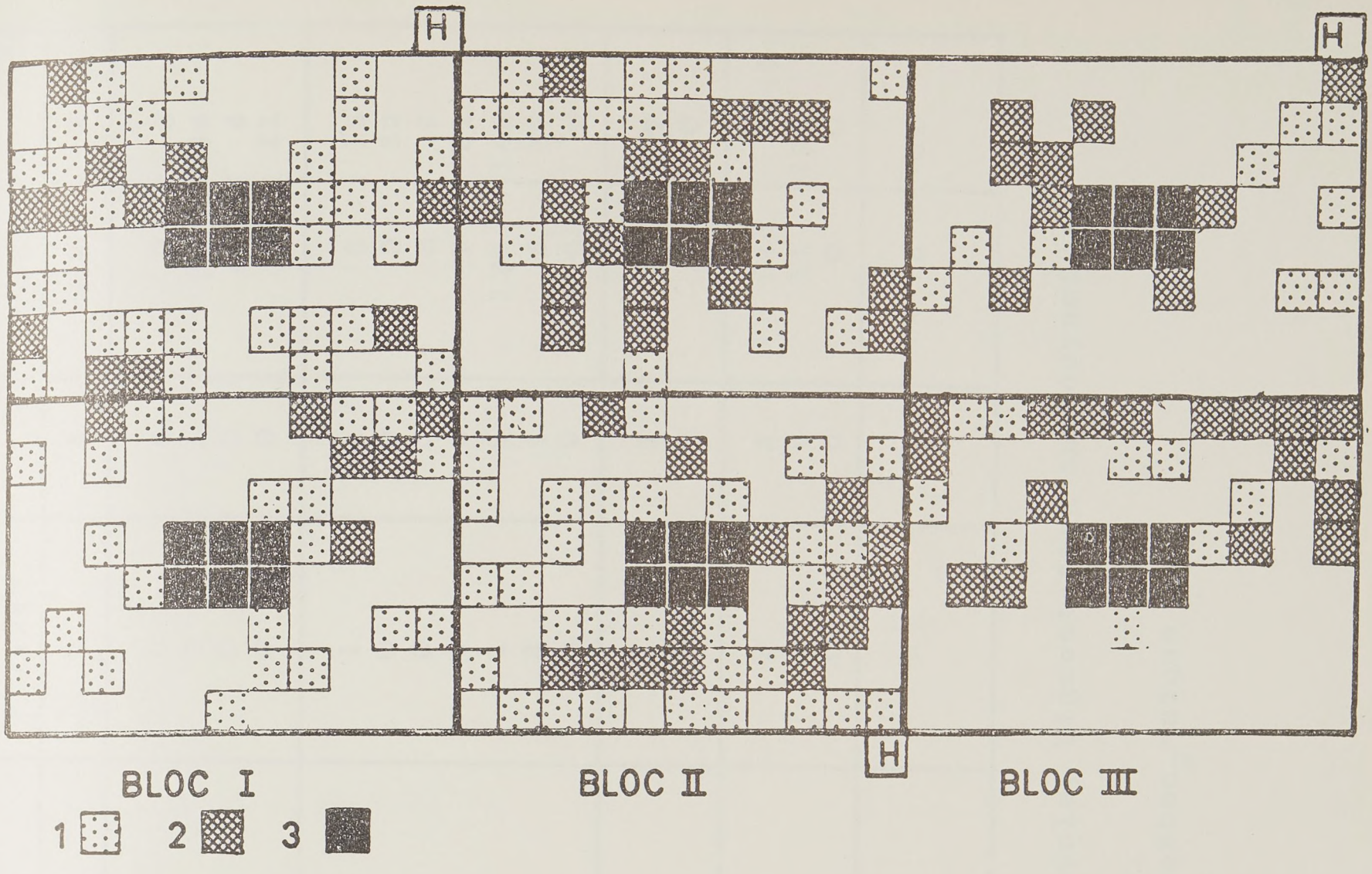
Date d'apparition et cycle des cicadelles dans la nature

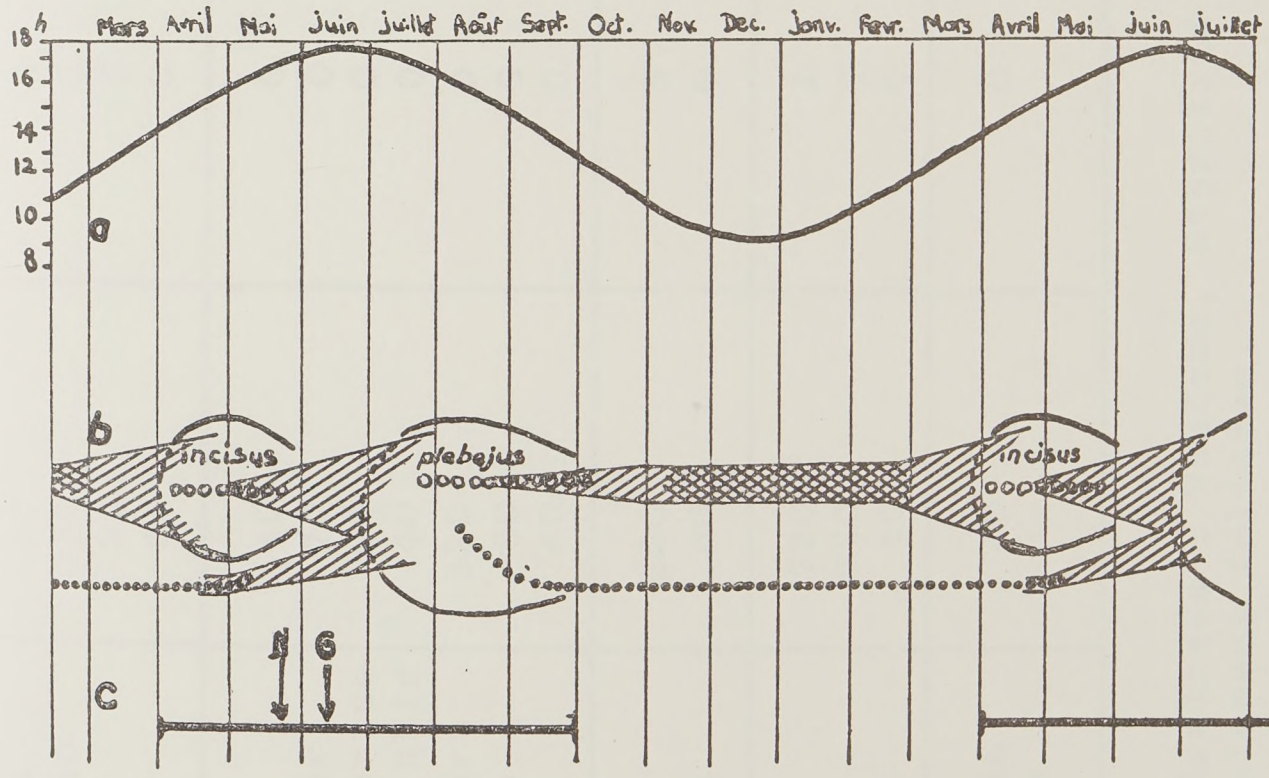
Les premiers adultes d'Euscelis ont été observés dès le mois d'avril, ce qui correspond bien avec le cycle établi par H.J.MULLER en Allemagne. L'observation comparée de l'apparition des symptômes sur tomate et du cycle d'Euscelis plebejus signalée vectrice par les auteurs étrangers, a été figurée sur la planche (1). L'insecte hiverne, soit à l'état de larves, soit à l'état d'oeufs. Dès le mois d'avril les premiers adultes apparaissent; ils vivent jusqu'au mois de juin et pondent des oeufs d'été qui, avec les oeufs d'hiver, donnent naissance à une nouvelle génération dont les adultes sont rencontrés aux mois de Juillet-Août-Septembre. Les travaux de MULLER ont montré que la photopériode intervient sur la morphologie du vecteur et que 2 espèces autrefois considérées comme distinctes : Euscelis incisus et Euscelis plebejus sont simplement des formes de jours courts et de jours longs de la même espèce: Euscelis plebejus. Macrosteles sexnotatus et Calligypona pellucida ont des cycles très voisins de celui d'Euscelis, avec une génération supplémentaire. Il en va différemment pour Aphrodes bicinctus, qui hiverne à l'état d'oeuf, et n'a qu'une seule génération par an. Si l'on considère, parallèlement aux cycles des vecteurs, la période de végétation de la Tomate dans la région Parisienne, on constate que les larves hivernantes peuvent servir de réservoirs de virus puisqu'elles apparaissent alors que la période de végétation de la tomate n'est pas terminée (fin Août, Septembre) et subsistent jusqu'au mois d'Avril-Mai en tant qu'adultes.

Dans le cas du champ supposé indemne de virus, où l'on disposait des foyers de plantes malades, seule la génération estivale paraît avoir agi. Au contraire, dans le cas de l'infection naturelle, les inoculations ayant eu lieu fin mai début juin, il semble que la génération hivernante ait pu intervenir. On conçoit donc facilement l'importance de cette génération dans l'épidémiologie du virus. Nous ferons remarquer ici que les plantes infectées naturellement appartenaient à des variétés très diverses ; variétés à petits fruits, à

fruits allongés, à fruits plats et cotelés, à gros fruits ronds et à fruits jaunes. Les observations ont été portées sur le tableau (2)

Si les vecteurs peuvent, dans certains cas, jouer le rôle de réservoirs de virus, la présence de plantes sources ne saurait être négligée. Nous n'avons jamais observé de liserons présentant les symptômes décrits par les auteurs étrangers. Par contre, les infections les plus graves se situent le plus souvent au voisinage de plantes ornementales, Chrysanthèmes en particulier. Il importerait de préciser le rôle de ces plantes dans l'épidémiologie du virus. Le chrysanthème se multipliant par bouturage et son cycle correspondant dans la nature à celui de la tomate, les pieds mères pourraient servir de réservoir de virus.





a : Photopériode
b: Cycle d'Euscelis Plebejus d'après Muller
c: Période de végétation de la *Tomate* dans la région Parisienne

N infection naturelle
G inoculation par greffage

o oeuf d'été
● oeuf d'hiver en diapause

stade imago

developpement larvaire

larves hivernantes

Variétés à		Nombre de plantes observées	Plantes infectées				
			le 27/6/63	30/7/63	11/9/63		
			3	3	3	2	1
Fruits allongés	Roi Imbert	20	0	0	0	0	0
	San Marzano	80	0	0	1	26	34
	Leonida	20	0	0	0	0	4
	Roma	60	0	0	0	0	11
Petits fruits 2 loges	Eclaireur	40	0	1	1	8	15
	Money Maker	70	0	0	0	8	32
	Devon Surprise	20	0	0	0	8	9
	Gloire du Rhin	40	0	0	0	7	21
Petits fruits (plus de 2 loges)	Super export	320	0	1	2	132	146
	Prim Serre	80	0	2	5	3	37
	Marise	40	0	0	0	4	8
Fruits plats et cotelés	Marmande	220	0	1	1	0	7
	Perdrigeon	60	0	0	0	0	0
Gros fruits ronds	Vaillance	720	1	3	3	(+)	(+)
	St Pierre	580	0	7	8	11	228
	Sioux	40	0	0	0	0	0
Fruits jaunes	Jaune grosse lisse nº 13	40	0	0	1	6	31

3 - Symptômes généralisés : Nanisme, Stérilité totale, Pigmentation anthocyanique intense. Enroulement foliaire.
2 - Symptômes localisés à une partie de la plante.
1 - Légers enroulement foliaire et pigmentation anthocyanique

(+) Mildiou généralisé.

TABLEAU 2
=========

CALENDRIER DES CAPTURES D'HOMOPTERES AUCHENORRHYNQUES

dans les champs de tomates et à leurs abords

(Versailles, Région de Montlhéry, Orléans) 1963

		Avril	Mai	Juin	Juil	Août	Sept.
FULGOROIDEA							
ARAEOPIDAE							
. Calligypona pellucida F.	V	+	+	+	+	+	
CIXIIDAE							
Cixius spp			+		+	+	
Hyalesthes obsoletus SIGN.	S				1♂		
CICADOIDEA							
CERCOPIDAE							
. Philenus spumarius L.	V			+	+	+	+
JASSIDAE							
Aphrodes bicintus SCHRK.	S					+	+
. Psammotettix confinis DNLBM	(V)			+	+	+	+
. Macrosteles sexnotatus FALL	S		+	+	+	+	+
. Euscelis plebejus FALL	S	+	+		+	+	
. Euscelidius variegatus KBM	(V)						+
. Evacanthus interruptus L.						+	+
TYPHLOCYBIDAE							
.. Empoasca flavescens F	(V)				+	+	+
Eupteryx atropunctata GOEZE				+	+	+	+

. Adultes capturés sur Tomate
.. Larves et adultes vivant sur Tomate

S : Espèce signalée vectrice du Stolbur
V : Espèce sugnalée vectrice de virose
(V): Genre signalé vecteur de virose.

TABLEAU N° 3

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BONFILS (J) & SCHVESTER (D) Les cicadelles dans leurs rapports avec la vigne dans le Sud-Ouest de la France. Annales des Epiphyties 1960 n°3, 325-336.

CARTER (W) - Insects in relation to plant disease. Interscience Publishers 1962, 705 pp

COUSIN (M.T) - Premières observations relatives à l'apparition dans la région parisienne, de maladies à virus de type "Jaunisse" sur tomate. Etudes de virologie appliquée n°4, Mars 1963, 55.

COUSIN (M.T)- Observations de quelques maladies à virus susceptibles d'être transmises par cicadelles en France. Etude de virologie appliquée n°5, Mars 1964.

MARAMOROSCH (K) Leafhoppers (Cicadellidoe) as vectors and reservoirs of phytogenic viruses. In Omagiu lui T.Savulescu. 1959 pp 421-442.

MESSIAEN (C.M) & ARNOUX (M) Essais de traitements fongicides sur tomates réalisés par l'INRA en 1959. Bulletin technique d'information des ingénieurs des Services Agricoles n°147 Février 1960.

MOREAU (J.P) A propos de l'élevage permanent d'un Jasside du genre Macrosteles. Revue de Zool.Agri. et appl. 1963 n° 10-12.

MULLER (H.J) Erster Nachweis einer Eidiapause bei den Jassiden Euscelis plebejus. Fall. und Linealatus Brullé (Hom.Auch.) Z.ang.Entom. Bd 48 (1961) pp. 233-241.

MUSIL (M) - Prenos virus parastolburu kriskem Euscelis plebejus : Biologia 1962, 17-5 p. 332-339.

POSNETTE (A.F) et ELLENBERGER (C.E.) Further studies of green petal and other leafhopper transmitted viruses infecting strawberry and clover. Ann. Appl. Biol.51 n°1 p.69-83.

RIBAUT(H) Homoptères Auchénorrhynques I Typhlocybidœ 1936, Faune de France 31 Lechevalier PARIS 232 pp.
II Jassidœ ; 1952 Faune de France 57, Lechevalier PARIS 474 pp.

RICOU (G) - Observations récentes sur les relations entre les cicadelles et leurs plantes hôtes. Revue des Sociétés Savantes de Haute Normandie-Sciences n° 25, 1962 p.31-53.

SUHOV (K.S) et VOVK (A.M.) Stolbur of Solaneous plants 1949 : USSR Academy of sciences publishers. Moscow Leningrad 103 pp.

TANASIJEVIC (N) - Prilog poznavanju faune cikada (Hom., Auch.) na crvenoj detelini u Jugoslaviji - Zastita Bilja 69-70 pp 93-106, 1962.

VALENTA (V) et MUSIL (M) 1961. Investigations on European yellow type viruses I. The stolbur virus Phytopath. Z 42,1, 1-38 p.376.

Effects of an Iron Chelator during the Extraction of Ribonucleic Acid.

Susan H. SCHENCK #

Introduction

While searching for improvements in the technique of phenol extraction of ribonucleic acid from viruses, it was observed that ethylenediamine tetra acetate (EDTA), an iron chelator, increased the number of local lesions obtained with the ribonucleic acid (RNA) extracts from tobacco mosaic virus. The phenol extraction is not difficult, but always the RNA transmission is less than with entire TMV particles when measured in numbers of local lesions produced on Xanthi tobacco plants. The reason for this is that all of the RNA present in the virus sample is never recovered, and that RNA itself is not as infectious as entire virus particles.

A variety of things are known to inactivate TMV-RNA samples in vitro (1). Ferrous ions have a remarkable ability to do this in very low concentrations. Therefore, it was thought that the addition of an iron chelator before the extraction proceedure might inhibit the destructive action of these ions which are present in the clarified sap.

Methods

TMV was raised in Samsun tobacco plants and all inoculations made to Xanthi tobacco. Tobacco leaf juice was clarified by freezing and low-speed centrifugation before extraction. Further dilutions were made with Tris-NaCl-HCl buffer at 0.05 M Tris and 0.05 M NaCl at pH 8.5.

RNA was extracted from TMV by the phenol method of Gierer and Schramm (3) with the modification of using bentonite to inhibit leaf ribonuclease (2). Ethylenediamine tetra acetate (EDTA) in the form of the disodium salt was added to the virus solutions before the extractions to give final concentrations of between one and eight grams per liter EDTA.

Iron solutions were made with ferrous sulfate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) or ferrous chloride ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) in distilled water to give final concentrations, when added to RNA solutions, of 0.1 or 0.2 mM. These solutions were nearly colorless at first, but became orange after a short time. All ultraviolet absorption tests were run at 260 m_μ wavelength. The graphs were corrected for the absorption due to EDTA and Fe^{++} ions.

Results

EDTA, added before extraction, increases the infectivity of the extractions (Fig. 1). If the action of EDTA were merely that of binding ferrous ions, one would expect infectivity to increase as concentration of EDTA were increased and then level off after a certain concentration. The actual concentration of purine and pyrimidine bases should remain the same throughout, assuming that the action of iron is merely to

Department of Plant Pathology - University of Wisconsin.

destroy the infectivity of the chain and not to destroy the bases themselves.

However, infectivity does not level off, but begins to decrease with more than 2 grams/liter EDTA finally falling nearly to the level obtained with 0 grams/liter EDTA. Furthermore, the ultraviolet absorption tests indicate that the quantity of bases does not remain the same with variations in EDTA concentration.

It is evident that the situation is more complex than at first thought and further investigation seemed called for.

Optical density of the RNA extractions varies directly with the infectivity except that density falls farther and more rapidly than infectivity upon addition of more than 2 grams/liter EDTA (Fig. 2).

It is very difficult to assess Figure 2 accurately due to the impossibility of knowing the final concentrations of EDTA in the extracts. So the effects of EDTA and Fe^{++} were tested separately on RNA extracts prepared in advance.

The optical density of the solutions at 260 mμ wavelength is seen to drop upon addition of EDTA (Fig. 3). Ferrous sulfate or ferrous chloride alone caused ultraviolet absorption of the RNA to increase noticably, but the presence of EDTA inhibited this effect somewhat (Fig. 4).

Discussion

EDTA acts on RNA to lower optical density. It does not seem likely that EDTA disrupts the RNA molecule since disruption by ribonuclease increased optical density (6,7). The possibility is not ruled out that EDTA and RMA form a complex which has a lower optical density than the sum of the two entities. Especially since Loring has stated that iron may be present in TMV-RMA (4,5).

Both divalent and trivalent metal ions are known to be bound by TMV-RNA. These include Hg^{++} and Fe^{+++} which were thought to be bound to the bases (8). Most divalent ions seem to cause a decrease in ultraviolet absorption (hypochromicity) but Hg^{++} acted to raise the optical density and, at the same time, to decrease the infectivity. Both these processes were reversible (9). Fe^{++} has the same effect on optical density and infectivity as Hg^{++}. Fe^{++}, however, was reported to destroy infectivity irreversibly (1,9).

My tests are not yet conclusive, but they seem to indicate that ferrous ions form a non-infective complex with RNA which is then lost during the extraction proceedure. EDTA, apparently by binding the Fe^{++} ions allows more infective RNA to be recovered from the virus. With an EDTA concentration greater than 2 grams/liter the EDTA itself begins to limit the infectivity and optical density of the extract.

Figure 1

The effect of EDTA on infectivity

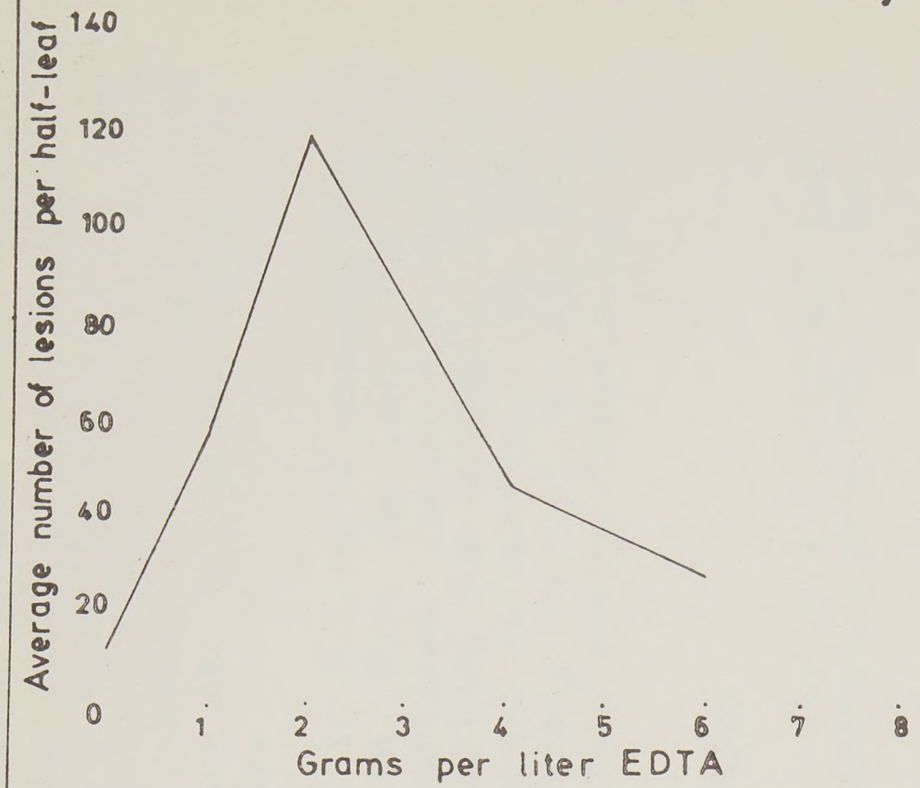


Figure 2

The effect of EDTA added befor extraction

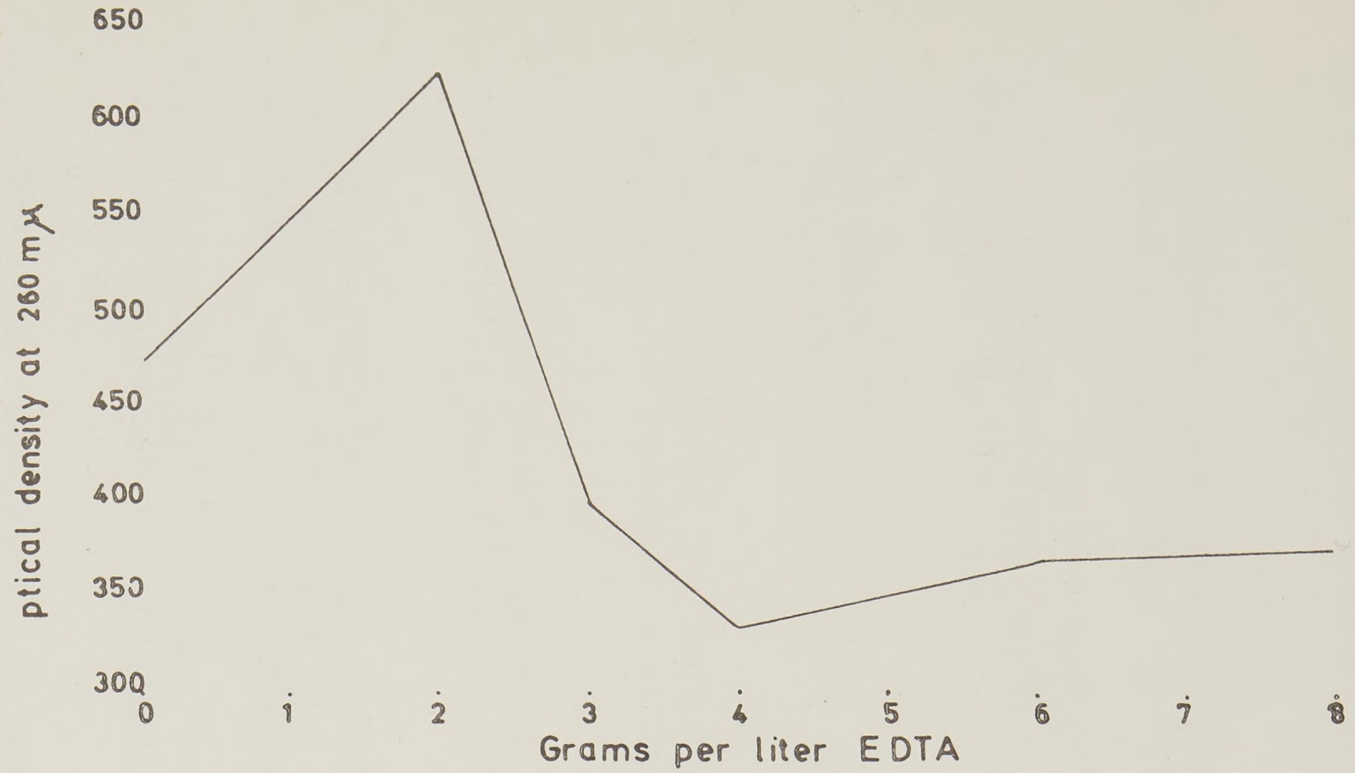


Figure 3

The effect of EDTA on prepared RNA

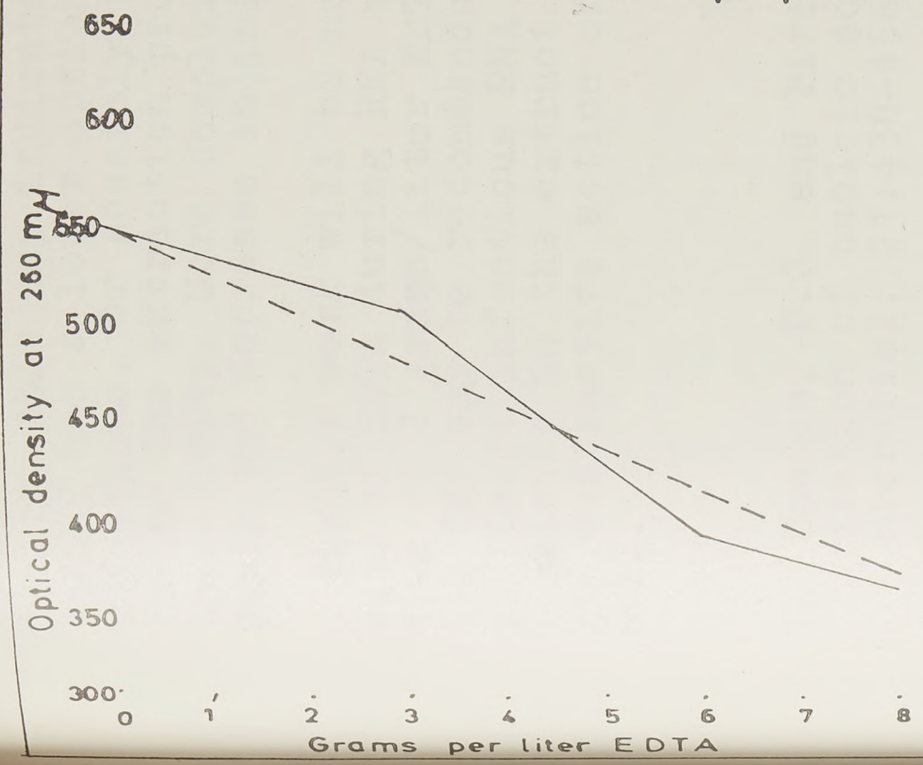
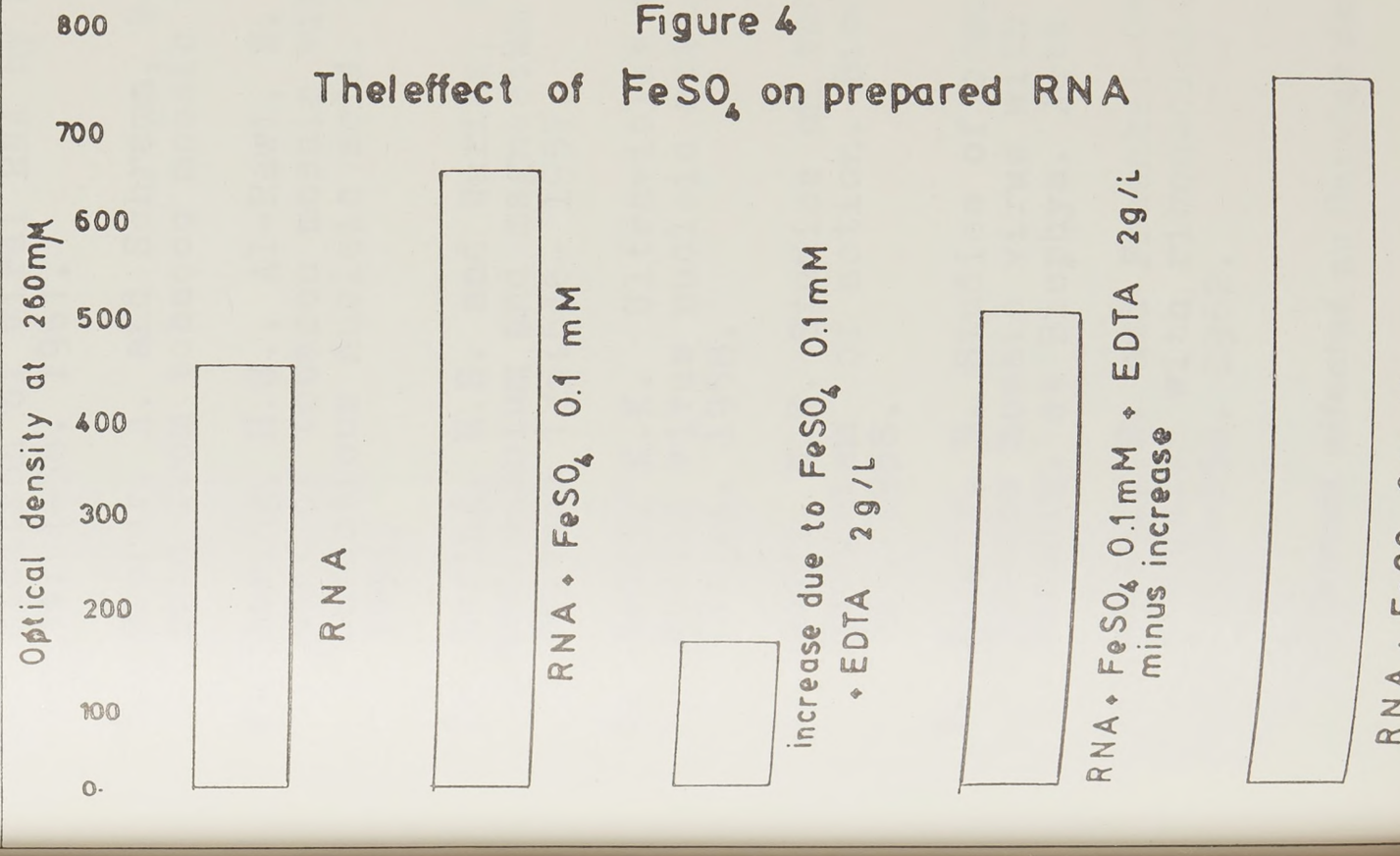


Figure 4

Theleffect of $FeSO_4$ on prepared RNA



Since the optical density decreases as well as the infectivity, this may indicate that the possible EDTA complex formed has a lower optical density than RNA and is also non-infectious. Or possibly the complex is infectious but is lost during the extraction procedure, . accounting for the loss in infectivity. More complexing after the extraction would explain the decrease in infectivity.

Further work will be necessary to determine exactly the action of EDTA during RNA extraction. None the less, the addition of 2 grams/liter EDTA to clarified tobacco sap containing TMV may be recommended as a method for obtaining higher yields of infectious RNA from phenol extractions. The EDTA remaining in the extract may possibly protect the RNA from the destructive action of metal ions during inoculation as well.

Bibliography

1. Bawden, F.C. and Pirie, N.W. The infectivity and inactivation of nucleic acid preparations from TMV. J. Gen. Microbiol. 21:438-456. 1959.

2. Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. and Tsugita, A. Purification of viral RNA by means of bentonite. Virology 14:54-58. 1961.

3. Gierer, A. and Schramm, G. Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. Nature 177:702-703. 1956.

4. Loring, H.S., Al-Rawi, S. and Fujimoto, Y. The iron content of tobacco mosaic virus and some properties of its infectious nucleic acid. J. Biol. Chem. 233:1415-1420. 1958.

5. Loring, H.S. and Waritz, R.S. Occurence of iron, copper, calcium and magnesium in tobacco mosaic virus. Science 125:646- 1957.

6. Reddi, K.K. Ultraviolet absorption studies on tobacco mosaic virus nucleic acid. Biochim. et Biophys. Acta 27:1-4. 1958.

7. Reddi, K.K. Studies on tobacco leaf ribonuclease. II. Mechanism of action. Biochim. et Biophys. Acta 28:386-391. 1958.

8. Singer, B. Studies of complexes of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus with Ag^{+}, Hg^{2+}, Ca^{2+} and Fe^{3+}. Biochim. et Biophys. Acta 80:137-144. 1964.

9. Singer, B. and Fraenkel-Conrat, H. Enzyme resistance of complexes with ribonucleic acid with metals. Biochemistry 1:852-858. 1962.

(Travail effectué au Service des Virus (VERSAILLES).

CONFIRMATION DE LA TRANSMISSION DU VIRUS DE LA DEGENERESCENCE INFECTIEUSE par XIPHINEMA INDEX (THORNE et ALLEN) et de l' ACTIVITE PARASITAIRE DE CE NEMATODE SUR LA VIGNE

par A. VUITTENEZ et R. LEGIN(1)

Des essais ont été poursuivis, principalement depuis 1958, pour déterminer le mécanisme de la transmission naturelle par le sol de la dégénérescence infectieuse (viroses du groupe des mosaïques) dans les Vignobles de l'Est, Centre-Est et Sud-Est de la France.

Nous avons effectué parallèlement des plantations temporaires de boutures de vignes saines dans les vignobles malades "in situ" et des expériences de culture en vases dans du sol naturellement infesté, ou dans un sol stérilisé recevant divers types de nématodes parasites, triés à la main et identifiés.

Les contaminations ont été jugées, selon les expériences, d'après l'observation des symptômes foliaires de mosaïque ou de panachure sur les Vignes repiquées dans les conditions naturelles en pépinière ou par une méthode indirecte en inoculant mécaniquement Chenopodium quinoa (cf. Virologie Appliquée 1963, no. 4, p. 133-142).

CONCLUSION DES ESSAIS

1.) - Le nématode Xiphinema index (THORNE et ALLEN) est présent dans le sol de nombreux Vignobles.

2.) - Dans des expériences de culture contrôlée en serre ce nématode peut transmettre à la Vigne le virus de la dégénérescence infectieuse.

.... / ....

---

(1) A ces travaux ont collaboré successivement pour le tri des nématodes Mr. STOCKY, Mmes CARBIENER et RISSO, Melle MUNCK et pour l'inoculation des plantes test herbacées Mr. KUSZALA.

Des échantillons de Nématodes ont été adressés pour détermination à MM. LUC (Station de Recherches Tropicales - ABIDJAN) et RITTER (Laboratoire des Nématodes - ANTIBES), ainsi qu'a plusieurs chercheurs étrangers; nous les remercions vivement.

3.) - Xiphinema index, lorsqu'il est abondant, exerce une action parasitaire grave sur la Vigne, en provoquant la tuméfaction des extrémités et la ramification anormale des racines. C'est l'aspect "coralloïde" décrit par les anciens auteurs PETRI et RAVAZ et considéré par eux comme un symptôme du Court-Noué.

Nous confirmons ainsi les résultats obtenus pour la première fois par HEWITT, RASKI & GOHEEN en Californie (1958) et reproduits par SEGUEIRA et DIAS au Portugal (comm. pers. 1962).

Nous enregistrons cependant des différences importantes par rapport aux chercheurs précédents :

1°) Dans nos expériences le virus de la dégénérescence infectieuse est décelé rapidement dans les racines de vignes soumises aux Xiphinema index infectieux (1 mois 1/2 dans une expérience); cependant l'ascension du virus dans la partie aérienne de la vigne, jusqu'à obtention des symptômes foliaires visibles de panachure ou de mosaïque, demande chez nous une très longue durée. Nos souches de virus possèdent une faculté d'expansion beaucoup plus lente que le "fanleaf" de Californie. Dans ces conditions, le recours à l'inoculation mécanique de C. quinoa est la seule technique d'investigation pratique pour mettre en évidence la transmission du virus sans équivoque et dans un délai acceptable.

2°) Le milieu septentrional, où ont été réalisés la plupart de nos essais, est beaucoup moins favorable que les vignobles du sud à la transmission naturelle du virus dans le sol :

- Xiphinema index, dans les vignobles observés, n'est jamais très abondant (quelques dizaines d'individus au plus par kg de sol dans la zone la plus riche - profondeur 60 cms -. Rarement Xiphinema index a été rencontré à une profondeur supérieure à 1 mètre.

- Lors de différents prélèvements, la quantité de Xiphinema index observés dans un même foyer varie beaucoup.

- Enfin, certains foyers de ceps malades groupés n'ont jamais livré de Xiphinema index.

Cette répartition capricieuse est attribuée à des facteurs du milieu défavorable au développement de Xiphinema index :

- La Structure physique du sol ne paraît pas

..../....

déterminante, car on observe Xiphinema index et on obtient des infections par la dégénérescence infectieuse dans les sols les plus lourds, aussi bien que les plus légers. Seuls les sables des dunes méditérranéennes, pratiquement dépourvus d'argile, n'ont jamais montré Xiphinema index.

- Certains sols contiennent des substances défavorables à Xiphinema index, ainsi le chlorure de sodium.

- Mais le facteur principal, limitant les populations de Xiphinema index, est le gel prolongé du sol, comme en témoigne l'essai ci-dessous :

Sol infesté	Jours de gel à env. -10°C	X. index actifs(*) / N. total récupéré
Pot A	11 jours dehors	0 / 70
B	10	0 / 25
C	8	4? / 31
D	5	4 / 12
E	3	40 / 40
F	1	40 / 70
G	0 témoins serre	24 / 25
H	0	28 / 28

(*) après conservation pendant 3 jours au labo, dans l'eau ordinaire.

Nous supposons que dans nos vignobles les plus septentrionaux le froid hivernal réussit à éliminer naturellement Xiphinema index de certains foyers de dégénérescence infectieuse, dans lesquels on ne le retrouvera plus par la suite.

La possibilité de transmission de la dégénérescence infectieuse par d'autres vecteurs que Xiphinema index a également été envisagée. Toutefois jusqu'à présent tous les essais de contamination en vases et les essais de contamination "in situ" dans les vignobles malades moins une exception (qui demanderait un complément d'informations), ont montré que les sols, où des contaminations naturelles se sont produites, contenaient Xiphinema index. Au contraire, les sols portant des vignes malades, n'ayant pas montré de Xiphinema index mais contenant la faune normale des vignobles de nos régions, en particulier les nématodes :

- Xiphinema II à mucron court (VUITTENEZ 1962) (2)

= Xiphinema II -idem- 1962 = X. diversicaudatum (MICOLETZKI)

- Xiphinema IV des sables méditérranéens (DALMASSO 1963)(3)

- Xiphinema americanum (COBB)

ainsi que Criconemoïdes sp. et Dorylaimus divers,

n'ont pas permis de transmettre la maladie jusqu'à présent.

Ces résultats, qui atteignent leur 6ème année et ont impliqué le jugement de quelque 6.000 boutures de Vigne, laissent penser que la dégénérescence infectieuse est transmise naturellement dans nos régions par Xiphinema index seul.

I. N. R. A.
Station de Pathologie
Végétale

COLMAR (1--Mars 1964)

---

(2) "Les Nématodes" - Journées d'études et d'informations VERSAILLES Novembre 1961 - Fédération Nationale des Groupements de Protection des Culture - ACTA p. 55-78.

(3) Influence de quelques facteurs biologiques ... sur la population des nématodes ... dans les vignobles méditérranéens (Thèse 3e cycle - Marseille 1963).

ESSAI DE TRANSMISSION DU VIRUS DE LA DEGENERESCENCE INFECTIEUSE par X.INDEX TRIES à la MAIN

Boutures de Vigne cultivées en sacs de plastique, drainés

JUILLET - NOVEMBRE 1963

XIe Série Nématodes élevés au contact de Vignes malades, triés, puis ajoutés aux sacs contenant : 2 boutures de Vignes saines (Vitis vinifera, Chardonnay) sans Vigne malade (sol sable pur).

TABLEAU IV (Ière Partie)

sac no.	Nématodes introduits Provenance :	Xiph. index récupérés (500g)	T.calculé	Aspect des racines	Récup. virus sur C. quinoa (2) Inoc. (1)	contrôle F13 s.	n.s.	TR.
1	TURQUIE (Göstepe - R. Marmara) 20 Xiph. index	132 (*)	937	quelques galles	1/10	9	1	+
2	-idem- 20 Xiph. index	392 (*)	2372	g. nombreuses	0/12	10	2	?
3	-idem-	336 (*)	2604	g. nombreuses	0/12	12	0	
4	-idem- 20 Xiph. sans mucron	35 (*)	271	R.normales	0/11	10	1	?
5	TURQUIE (Menemen R. Egée) 24 Xiph. index	900	6120	g.nombreuses	1/12	11	1	+
6	GARD (Aigues-Mortes Servel) 21 Xiph.index	1160	9336	g.nombreuses	12/12	0	12	+
7	TEMOIN rien	42 (*)	320	R.normales	0/10	10	0	

(1) N. quinoa malades / n. total d'inoculés survivants. (sympt. "vein clearing")
(2) cf. plus loin.
(*) Invasions secondaires, en cours d'expérience, par des nématodes d'espèces non introduites (Dorylaimus sp. et, dans les sacs 4 & 7, Xiph. index.)

ESSAI DE TRANSMISSION DU VIRUS DE LA DEGENERESCENCE INFECTIEUSE DE LA VIGNE
par différents types de nématodes triés à la main
Boutures de Vignes cultivées en sacs de plastique, drainés

JUILLET - NOVEMBRE 1963

IIe Série Nématodes triés ajoutés aux sacs contenant 1 bouture de Vigne saine (Kober 5BB) et 1 bouture malade réservoir de virus.

TABLEAU IV (2ème Partie)

sac no.	Nématodes introduits Origine (4-VII-63)		Nématodes types récupérés ds 500 g	T.calc.	Récupération du Virus sur C. quinoa (2) inoc.(1) racines	contrôle VMV	F_{13}	TR.
1	HERAULT Frontignan-Cayrol	17 X.index	29	162	0/8	8	0	
2	TURQUIE Bag-Yusu (Rég Bergam)	20 X.index	89 (*)	516	1?/9	9	0	
3	TURQUIE Göstepe (R.Marmara)	20 X.index	58	330	1/7	6	1	+
4	-id.-	20 X.index	248	1760	2/10	8	2	+
10	VAUCLUSE Ch.N.Pape-Lansan	17 X.index	676	3784	2/12	10	2	+
6	HAUT-RHIN Colmar - Lauenstein	21 Xiph. II	11	64	1?/9	9	0	
7	-id.-	22 Xiph. II	9	54	0/12	12	0	

.... / ....

TABLEAU IV 2ème Partie (fin)

8	HERAULT Frontignan - Cayrol	13 X. amer.	0(✲)	0	0/11	11	0	
9	VAUCLUSE Ch.N.Pape Lanson	22 X.amer.	0	0	0/1	12	0	
5	HAUT-RHIN Colmar - Lauenstein	19 Long.	0	0	2?/7	7	0	
11	VAUCLUSE Ch.N.Pape Lanson	28 Crico.	37(✲)	242	0/11	11	0	
12	-id.-	15 Crico.	56(✲)	288	0/12	12	0	
13	Témoins sans		0(✲)		0/12	12	0	
14	nématodes		0(✲)		0/11	11	0	
15	introduits		0(✲)		0/10	10	0	

INOCULATION PRIMAIRE avec extraits de racines de Vigne :

(1) Nombre de quinoa malades / nombre total d'inoculés survivants. (sympt. "vein clearing").

INOCULATION DE CONTROLE :

(2) les C. quinoa déjà inoculés par les extraits de racines de vignes sont surinoculés par une souche très forte du virus de la vigne (souche F_{13}). Les plantes (s.) non infectées par l'inoculation primaire contractent une maladie grave sous l'effet de F_{13}. Par contre les plantes porteuses du virus VMV - même d'une souche faible - restent insensibles (n.s.) à F_{13} (phénomène de prémunition).

Virol. Appl.
INRA 1964 No. 5

SOUCHES de VIRUS à HAUTE AGRESSIVITE ISOLEES de VIGNES ATTEINTES de DEGENERESCENCE INFECTIEUSE

par A. VUITTENEZ, Mlle M.C. MUNCK

et J. KUSZALA

Par inoculation mécanique d'extraits de vignes présentant des symptômes foliaires de mosaïque, panachure ou malformation, il est possible de transmettre des virus aux plantes herbacées (cf. Virologie Appliquée no. 4, p. 133 - 1963).

Un grand nombre d'isolements ainsi obtenus à partir de vignes d'Alsace, Bourgogne et sud-est de la France, ont été conservés par repiquages successifs sur Chenopodium quinoa, C. amaranticolor, Gomphrena globosa ou Amarantus patulus.

Ces repiquages, qui avaient lieu à la même date avec des inoculums d'âge et de dilution comparables (facteurs qui pourraient perturber la durée d'incubation et l'expression finale des symptômes), ont montré des différences dans la virulence de nos divers isolements. Ces différences intrinsèques sont plus importantes encore vis-à-vis des isolements obtenus à l'étranger, notamment dans le spectre de plantes hôtes : ainsi le haricot, le concombre et les Nicotiana cités comme plantes hôtes en Californie et au Portugal, n'ont jamais été infectés par les souches du type ordinaire de notre région.

D'après la bibliographie, les virus isolés jusqu'à présent à partir de vignes malades peuvent être rapportés selon les cas à trois virus de type "Ringspot" distincts l'un de l'autre : le groupe apparenté au virus de la mosaïque de l'Arabis (CADMAN, HARRISON, DIAS 1960), le groupe du Ringspot de la tomate, responsable de la maladie du "yellow vein" (GOODING et HEWITT 1962), enfin le Blackring de la tomate (STELLMACH et BERCKS, 1963).

Nous avons cherché à identifier nos propres isolements par trois types d'expériences :

1°) l'inoculation d'une gamme de plantes test herbacées par nos souches de virus en comparaison avec des souches types de divers virus reçues de l'étranger.

.... / ....

2°) La surinoculation de plantes test hébergeant déjà un premier virus , pour la mise en évidence du phénomène de prémunition.

3°) Enfin, des analyses sérologiques croisées entre les divers antigènes virus et leurs antisérums.

R E S U L T A T S

A)- Comparaison des symptômes foliaires des différents isolements.

D'après la réaction sur les Chénopodes, nos isolements de virus se classent en 3 groupes de gravité croissante :

1°) les "souches ordinaires" (Type VMV, Panachure, Chardonnay - Meursault). A ce type appartiennent la majeure partie des isolements que nous avons obtenus (plus de 50 jusqu'à présent.

Sur Chenopodium quinoa, dans les meilleures conditions d'extériorisation, on obtient d'abord, sur les feuilles inoculées, des lésions locales minuscules, mais elles se forment de façon très capricieuse. Les symptômes systémiques se manifestent par un éclaircissement des nervures des jeunes feuilles, puis une mosaïque légère qui disparaît totalement une quinzaine de jours après le début des symptômes. Les plantes "rétablies" ont un aspect sensiblement normal (photo No. 2 à droite).

En hiver à faible lumière (durée et intensité) le "vein clearing" ne se montre même pas; on note seulement un léger arrêt de croissance et une décoloration des jeunes feuilles du sommet (c'est le symptôme que nous appelons "sommet blanc").

Sur Chenopodium amaranticolor certains isolements se différencient les uns des autres : la plupart ne produisent comme symptômes systémiques qu'une mosaïque plane, mais quelques uns donnent des malformations avec atrophie "en cuiller" des jeunes feuilles (ex. souche VMV D207 isolée de Kober 5BB).

Avec aucun des virus de tout ce premier groupe, nous n'avons obtenu d'infection de plantes test en dehors des Chénopodiacées et Amarantacées.

..../....

2°) Souches à haute virulence. Dans une expérience d'inoculation à partir de Muscat très malade (provenant de Frontignan - Hérault) (1), nous avons obtenu deux isolements (F13 et F14) produisant des symptômes particulièrement graves sur Chenopodium quinoa : lésions locales chlorotiques assez grandes sur les feuilles inoculées (photo No. 1) puis des symptômes systémiques d'éclaircissement des nervures, enfin une mosaïque intense accompagnée de laciniure du limbe. Contrairement au groupe précédent, ces symptômes systémiques sont durables (photo No. 2 à droite). En hiver le "vein clearing" ne se manifeste pas, mais il est remplacé par une épinastie intense et parfois le déssèchement du sommet végétatif.

Parmi les autres plantes test essayées jusqu'à présent, le cornichon (var. vert de Paris), inoculé par la souche F13, a montré des lésions locales chlorotiques sur les cotylédons, mais sans généralisation du virus au reste de la plante.

3°) Isolements atypiques. On a observé, dans trois expériences indépendantes, des plantes manifestant des symptômes particulièrement sévères. Les souches obtenues (VGO, 1C et C.L.) produisent aussi bien chez C. quinoa que C. amaranticolor des lésions locales chlorotiques et parfois nécrotiques sur les feuilles inoculées, puis des symptômes de choc intenses sur les jeunes feuilles du sommet avec mosaïque et épinastie; le sommet peut se déssécher et si la plante est très jeune la mort en résulte). Cependant les plantes, surtout C. amaranticolor, arrivent à se rétablir dans le cas général, mais leur croissance reste réduite et leurs feuilles plus petites et plus dentées que celles des plantes saines.

En dehors des Chénopodes un grand nombre d'autres plantes herbacées peuvent être infectées par les isolements du groupe 3 :

- Tabac (lésions locales puis Ringspot et Line Patterns),
- Haricot (occasionnellement lésions locales sur les feuilles primaires inoculées, puis symptômes de choc sur la première vraie feuille et épinastie du sommet.
- Cornichon : (lésions locales chlorotiques sur cotylédons inoculés, très forte mosaïque sur la première feuille et arrêt à peu près complet de la végétation ou croissance en "court-noué" de la tige.
- Tétragone (lésions locales chlorotiques puis déssèchement du sommet). Ces symptômes correspondent à ceux du groupe la mosaïque de l'Arabis (AMV).

..../....

---

(1) adressé par D. BOUBALS (voir Progrès Agricole et Viticole CLVII 1962 p. 144).

B) - Relations immunologiques entre les virus associés aux trois groupes de symptômes.

Des Chenopodium quinoa, déjà inoculés par le type 1 ordinaire (souche Panachure Chardonnay) et parvenus au stade de rétablissement, sont surinoculés par le type 2 virulent (souche Frontignan F13) en comparaison avec des témoins sains de même âge, qui reçoivent à cette date seulement la souche F13.

Huit à dix jours après cette inoculation tous les témoins contractent la maladie grave déclanchée par F13, mais aucune des plantes infectées antérieurement par la souche ordinaire ne contracte d'infection généralisée (1 ou 2 lésions locales tout au plus apparaîssent sur certaines feuilles inoculées sans doute incomplètement envahies par le premier type de virus). Cette prémunition montre que les virus des groupes 1 et 2 sont étroitement apparentés.

Par contre si des C. quinoa, inoculés par le type ordinaire et rétablis comme plus haut, reçoivent une surinoculation par le virus de la mosaïque de l'Arabis (souche Cadman 1960) ou un isolement du groupe 3 (expériences faites avec 1 C et CL), des lésions locales nombreuses apparaîssent sur toutes les feuilles inoculées et toutes les plantes manifestent ensuite des symptômes systémiques graves avec déssèchement du sommet.

Ces résultats montrent que les "isolements atypiques" du groupe 3 et le virus de la mosaïque de l'Arabis (AMV) ne sont pas apparentés avec les isolements des deux premiers groupes, que nous dénommerons virus de la mosaïque de la Vigne (VMV).

C) - Comparaison des propriétés sérologiques

Cette étude consistait à tester en croix les différents sérums et antigènes homologues et hétérologues.

a)- Antisérums Les virus de nos isolements et les souches étrangères ont été multipliées sur de jeunes Chenopodium quinoa. Les plantes, récoltées juste à l'apparition des symptômes, ont donné le meilleur rendement possible en virus. Celui-ci a été concentré, partiellement purifié et injecté aux lapins.

Plusieurs sérums nous ont été adressés directement de l'étranger (*) .

..../....

(*) Nous remercions vivement les Dr CADMAN, HEWITT et BERCKS pour leurs échanges de matériel et d'informations.

b) Antigènes Pour effectuer les réactions sérologiques, les jus brut de chénopodes sont utilisables avec certains virus (ceux du groupe AMV). Par contre, avec les virus du groupe VMV la concentration en virus, toujours assez faible, oblige à concentrer par un cycle d'ultracentrifugation. On a opéré généralement avec des antigènes partiellement purifiés et concentrés (25 à 50 fois).

c) Dispositifs de test La méthode de précipitation en milieu gélosé (Ouchterlony) a été employée. Nos sérums donnent une précipitation anti-protéines normales localisée près des réservoirs d'antisérums, mais cela ne gêne pas l'observation des précipités anti-virus, toujours les plus proches des réservoirs d'antigènes. Nous avons donc pu travailler, même avec des sérums peu dilués.

La disposition des trous dans la gélose a été d'abord choisie pour déterminer le titre des sérums (= dilution limite permettant encore l'observation d'un précipité visible) en présence des antigènes homologues et hétérologues. Un autres chéma a été adopté pour observer le raccordement des arcs de précipitation entre les divers virus (tableau ci-contre).

Les résultats montrent que :

1°) - Les sérums anti-VMV , préparés avec nos souches VMV du type ordinaire (s23) et avec la souche forte VMV F13 (s30 et 31), réagissent avec tou les virus du groupe VMV, avec raccordement complet des arcs de précipités. De même, les sérums reçus de l'étranger (GVF "fanleaf" Cadman et s334 "fanleaf" Hewitt) réagissent avec notre groupe VMV.

2°) Notre sérum anti-Arabis mosaïc (s8) et les autres anti-sérums AMV reçus de l'étranger (s332-333 Hewitt) réagissent très bien avec la souche Arabis mosaïc dont nous disposons (souche Cadman 1960) ainsi qu'avec les "isolements atypiques" (VGO - 1 C et C.L) en donnant un raccordement complet des arcs de précipités. Tous ces isolements appartiennent donc au groupe de AMV.

3°) - Certains anti-sérums AMV, (reçus de l'étranger) réagissent avec nos isolements VMV, d'autres ne réagissent pas. Ainsi notre sérum anti-AMV (s8) ne réagit pas avec nos isolements VMV (souche Pan. Chardonnay), alors que son titre homologue est 1/128, en présence de AMV.

4°) - Les sérums préparés à partir de virus Vigne à l'étranger (s334 "fanleaf" Hewitt et GVV "fanleaf" Cadman) réagissent à la fois avec AMV et avec nos isolement VMV Pan. Chardonnay ou VMV F13).

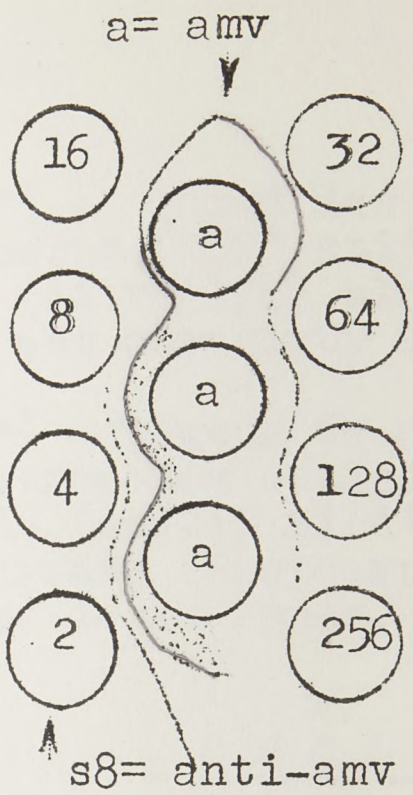
..../....

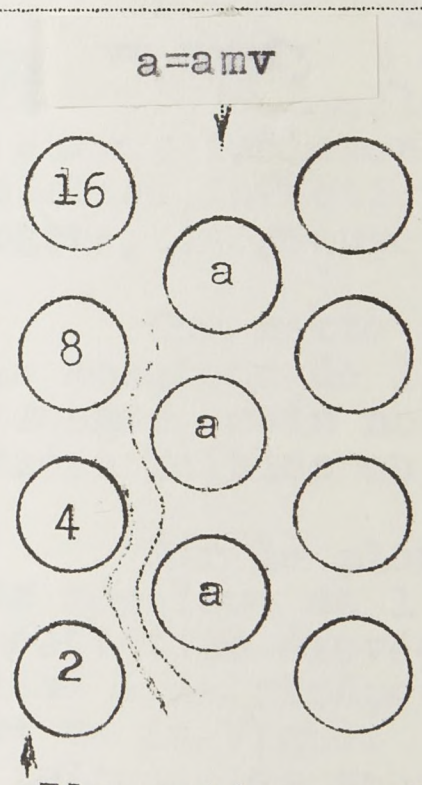
DILUTIONS LIMITES DES ANTISERUMS POUR REACTION VISIBLE

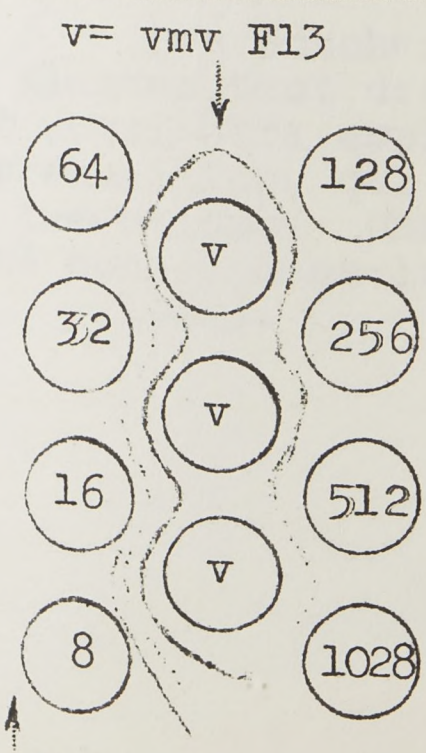
EN PRESENCE DES DIFFERENTS ANTIGENES

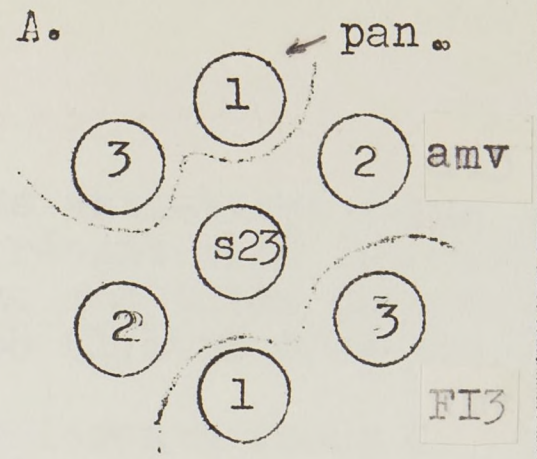
(Méthode Ouchterlony)

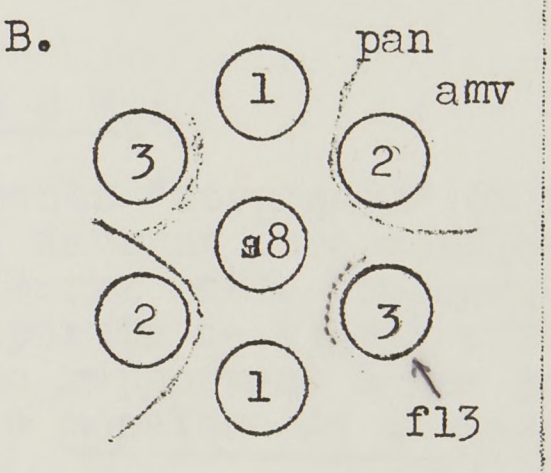
ANTIGENES				ANTISERUMS
RRSV Pfeffing. TBRV TRSV	Virus mosaïque ARABIS (souche CADMAN)	Virus mosaïque VIGNE F_{13}	Pan.	
-	128	? 0	0	$^{s}8$ - Colmar AMV
-	512	64	16	$^{s}332$-333_(HEWITT) AMV - Ecosse
-	64	512	512	^{s}GFV_"fanleaf" (CADMAN) (Italie)
-	16	128	512	$^{s}334$_"fanleaf" (HEWITT) (Californie)
-	4 à 8	(1024) 128	128	$^{s}30$_Colmar VMV F13
-	0	32	32	$^{s}23$_Colmar VMV Panachure
RR + Pf + TB + TR +	-	-	-	$^{s}11$_Raspberry Ringspot $^{s}10$_Pfeffingen $^{s}36$_Tomato Black Ring $^{s}37$_Tomato Ringspot

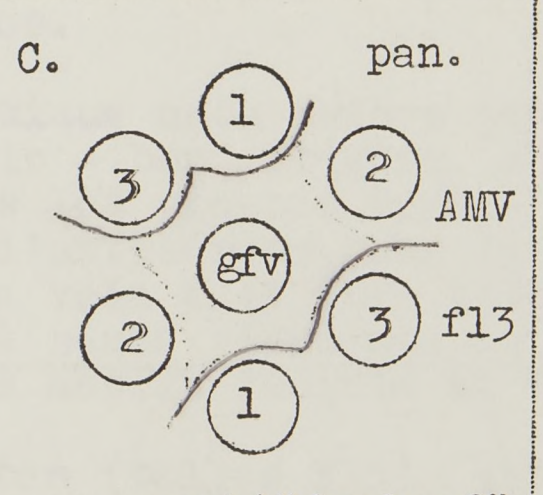

a= amv
16
32
a
8
64
a
4
128
a
2
256
s8= anti-amv

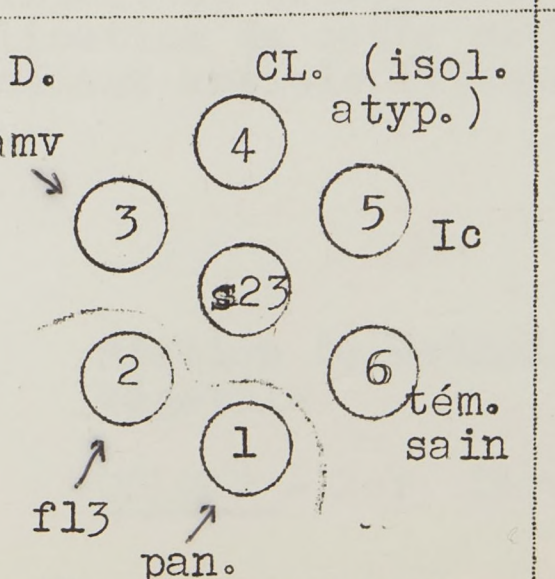

a=amv
16
a
8
a
4
a
2
s31= anti-vmv f13

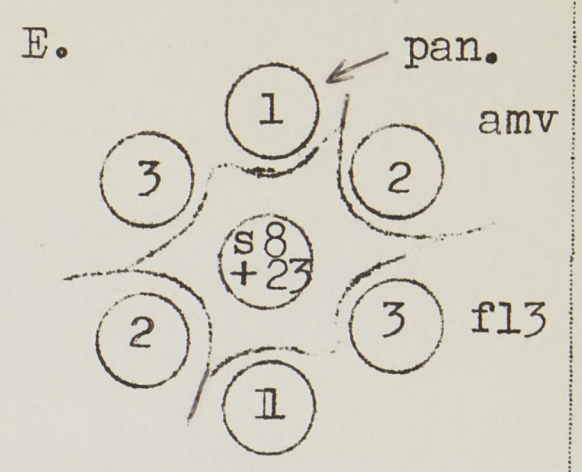

v= vmv F13
64
128
v
32
256
v
16
512
v
8
1028
s31= anti vmv F13

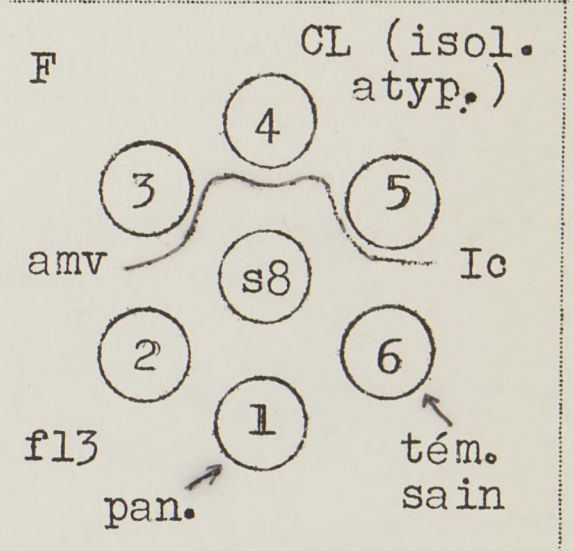

A.
pan.
1
3
2
amv
s23
2
3
1
FI3
s23= anti vmv. pan.

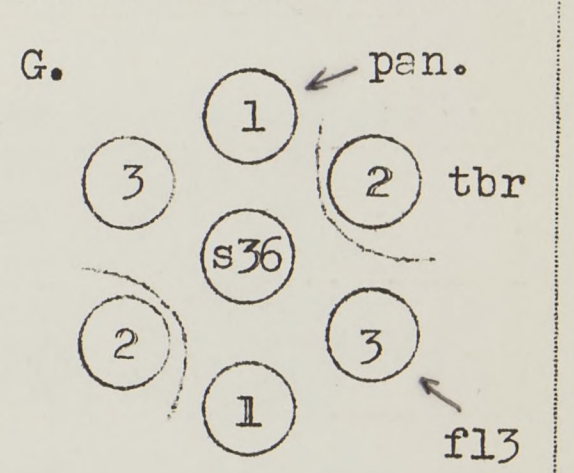

B.
pan
amv
1
3
2
s8
2
3
1
f13
s8= anti arabis mos.

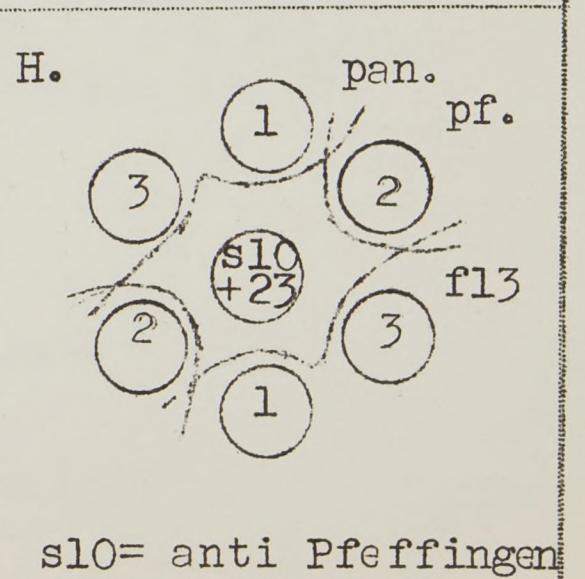

C.
pan.
1
3
2
AMV
gfv
2
3
f13
1
sGFV= anti"fanleaf"
Cadman


D.
CL. (isol.
atyp.)
amv
4
3
5
Ic
s23
2
6
tém.
sain
1
f13
pan.
s23= anti vmv pan.


E.
pan.
1
amv
3
2
s8
+23
2
3
f13
1
s8= anti amv
+s23=antivmv.pan.


F
CL (isol.
atyp.)
4
3
5
amv
Ic
s8
2
6
1
f13
tém.
sain
pan.
s8= anti amv


G.
pan.
1
3
2
tbr
s36
2
3
1
f13
s36= anti Tomato
Blackring


H.
pan.
1
pf.
3
2
s10
+23
f13
2
3
1
s10= anti Pfeffingen
+s23= anti vmv pan.

5°) - Parmi les sérums anti-virus Vigne préparés à Colmar, le sérum (s30) anti-F13 réagit très faiblement en présence de AMV (titre 1/8) alors que son titre en présence du virus VMV F13 est supérieur à 1/256 (1/1028 dans une expérience).

6°) - Aucun de nos isolements issus de Vigne ne réagit en présence des antisérums du virus du Blackring ou du Ringspot de la tomate, ni d'aucun autre virus de type Ringspot ou apparenté (Raspberry ringspot, Pfeffingen du Cerisier, Panachure de la ronce, Mosaïque de la luzerne).

C O N C L U S I O N :

A part 3 isolements "atypiques" du virus de la mosaïque de l'Arabis - qui devront être confirmés, car une infection accidentelle en serre reste toujours possible - tous nos autres isolements à partir de Vignes atteintes de dégénérescence infectieuse se rapportent à une entité virologique homogène, le groupe de la mosaïque de la vigne (VMV).

Une nette parenté sérologique existe entre le virus de la mosaïque de l'Arabis et les virus de Vigne obtenus à l'étranger, mais nos propres souches donnent des réactions croisées faibles ou nulles.

Sur le plan pratique nous avions pensé que le virus de la mosaïque de l'Arabis - bon antigène, atteignant une concentration élevée dans les plantes test - pourrait être utilisé à la production d'antisérums pour le contrôle sanitaire de la Vigne. Cette voie doit être totalement abandonnée puisque les souches à haute virulence de type VMV permettent d'obtenir des sérums actifs jusqu'à un titre de 1/512.

Les souches fortes (telles F13), qui produisent sur les plantes test des symptômes intenses et permanents, peuvent aussi être employées en pratique pour des expériences de prémunition, qui augmentent la sensibilité du diagnostic des infections. Une application de cette méthode sur C. quinoa a été donnée dans le précédent article (Virol. Appl. No. 5, p. 1964).

Station de Pathologie
Végétale

COLMAR - 1er Mars 1964

LEGENDE des PHOTOGRAPHIES

No. 1 Chenopodium quinoa infecté par le virus de la mosaïque de la vigne, souche forte F13 isolée de Muscat de Frontignan (lésions locales sur feuilles inoculées et symptômes secondaires de mosaïque).

No. 2 Comparaison de la souche F13 (à gauche) et d'une souche ordinaire Chardonnay panachure (à droite) sur C. quinoa; stade chronique 20 jours après l'inoculation.

No. 3 Test sérologique en présence d'un antisérum du virus de la mosaïque de la Vigne.

Les réservoirs centraux contiennent l'antisérum VMV (s23) et les réservoirs latéraux les antigènes préparés de C. quinoa.

Dans la colonne de gauche jus simples de chénopodes; dans celle de droite extraits purifiés (méthode au butanol + chloroforme) et concentrés (x 20) par ultracentrifugation.

De haut en bas témoin sain, VMV souche F13, VMV souche ordinaire, AMV("Arabis mosaïc" souche Cadman 1960.)

Les 2 isolement du virus de la Vigne réagissent avec raccordement exact des arcs de précipité. L'isolement de Arabis mosaïc ne réagit pas.

No. 4 Test sérologique en présence d'un antisérum du virus de la mosaïque de l'Arabis.

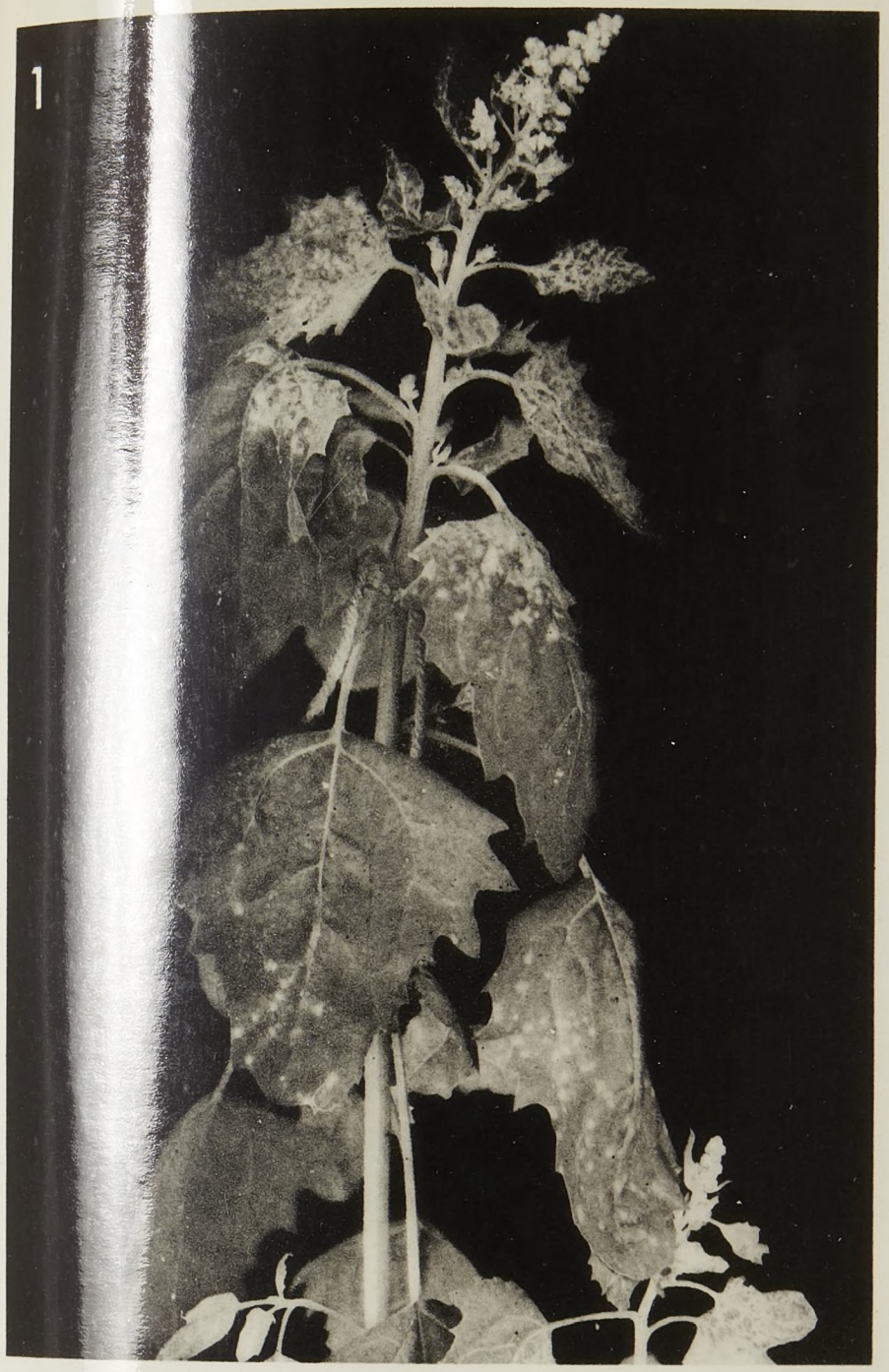
Les réservoirs centraux contiennent l'antisérum AMV (s8) et les réservoirs latéraux les antigènes purifiés et concentrés de C. quinoa.

Dans la colonne de gauche, de haut en bas : VMV souche Chardonnay "palmettes", VMV souche F1", VMV souche GB, VMV souche Traminer "palmettes";

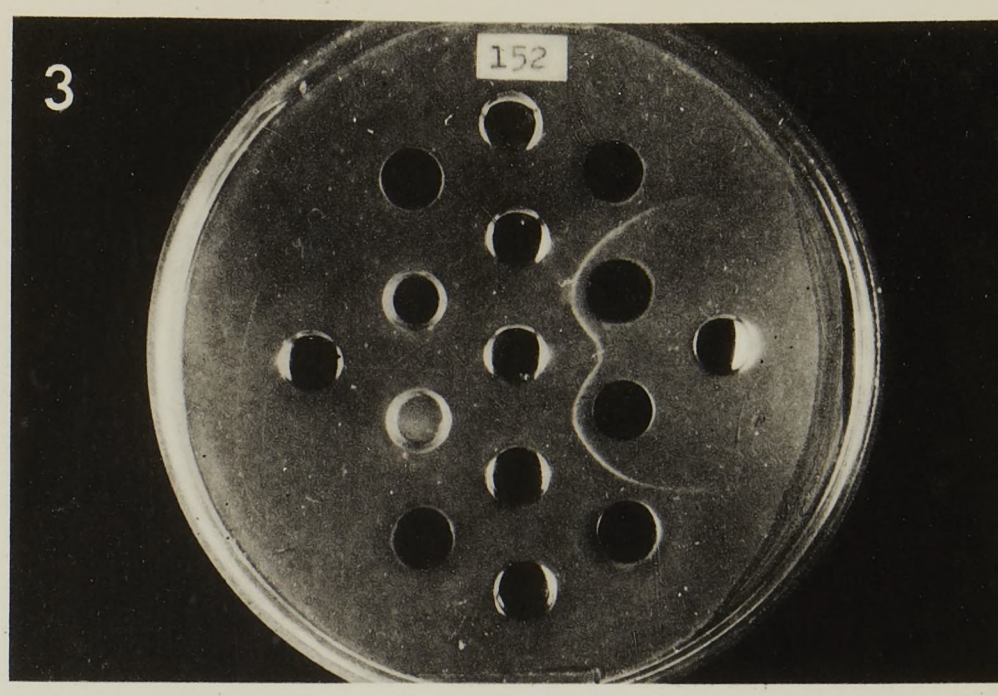
dans la colonne de droite : AMV souche Cadman 1960, virus isolé de Rubus, souche atypique Vgo apparentée à AMV (cf. texte), témoin sain.

Seuls les 2 extraits du groupe "Arabis mosaïc" réagissent.

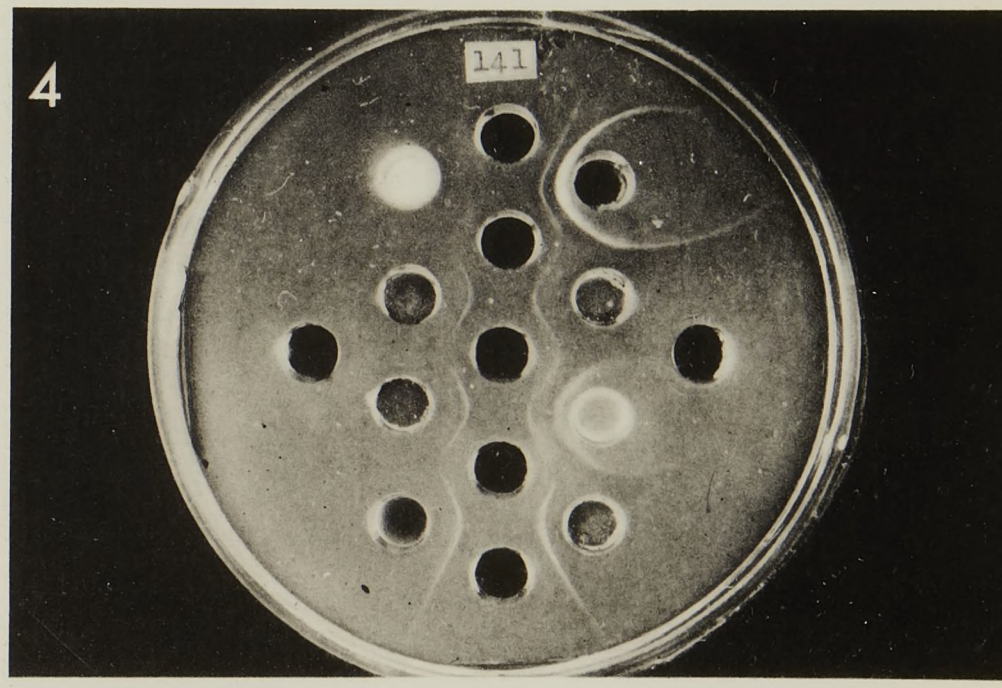
1



3



4



2

Influence théorique de certaines méthodes de travail sur la fréquence des viroses dans les pépinières fruitières.

G. MORVAN.

-:-:-

Afin de limiter la diffusion des maladies à virus des arbres fruitiers, on recommande d'une façon générale d'éviter un certain nombre d'opérations qui tendent à accumuler les virus chez les plants produits en pépinières : reprise systématique de greffons sur les arbres produits précédemment, utilisation de drageons comme porte-greffes, etc,...

En 1960, GILMER et BRASE (1), se livraient à des considérations théoriques sur l'influence de la contamination des porte-greffes et des greffons sur l'accroissement de la fréquence des virus. Ils arrivaient à la conclusion qu'étant donné la pratique habituelle des pépiniéristes, qui consiste à prélever les greffons utilisés pour les multiplications sur des plants produits les années précédentes, il est plus important de disposer de porte-greffes sains que de greffons sains.

Ayant été appelé à visiter des vergers et des pépinières, nous avons constaté combien certaines méthodes discutables pour se procurer les greffons et les porte-greffes, étaient malheureusement pratiquées. Il ne semble pas exagéré de leur attibuer la fréquence de certains graves accidents observés dans les cultures. Pour mieux comprendre les risques courus, nous avons pensé utile d'examiner l'influence théorique de ces différents procédés sur la contamination des plants produits.

CONSIDERATION GENERALE SUR LA DIFFUSION DES VIRUS CHEZ LES ARBRES FRUITIERS.

Les virus peuvent être disséminés par des vecteurs, mais parmi ceux infectant les arbres fruitiers, nombreux sont ceux qui ne sont pratiquement transmis que par la greffe.

La succession des greffages accroît la fréquence des virus et crée des complexes entre virus qui isolément ne provoquent pas de maladies définies.

Si on se limite comme nous le ferons dans toute cette étude à la transmission par la greffe, nous distinguerons les facteurs suivants qui conditionnent la contamination.

.../...

1° - La possibilité de sélection au moment de la récolte du matériel.

Dans certains cas les conséquences de l'infection peuvent être si graves, que la probabilité pour que l'on prélève du matériel malade est très réduite. Bien souvent cependant à l'époque où l'on récolte les greffons, les symptômes ne sont pas visibles. Ceci est particulièrement vrai pour les porte-greffes et les greffons récoltés en hiver. Le plus souvent, aussi, bien des symptômes n'attirent pas l'attention.

Il peut s'exercer également une sélection à rebours lorsque la maladie modifie la végétation dans un sens économiquement intéressant, comme l'avance ou le retard de la maturité même si l'arbre doit en mourir ou ne donner qu'une récolte très faible. De même un greffeur aura tendance à prendre des greffons d'une taille bien définie. Les poiriers sains par exemple fournissent souvent des greffons trop gros, tandis que sur certains arbres affaiblis, ils sont de la taille optimale.

En ce qui concerne les porte-greffes, l'infection peut diminuer la vigueur des pieds-mères et réduire le nombre de marcottes produites. Il est possible que dans certains cas, la reprise des boutures provenant de plants contaminés soit plus faible, ce qui réduirait dans une certaine mesure la proportion de boutures contaminées comparativement à la proportion de pieds-mères contaminés.

Dans le cas de l'utilisation de drageons, il est à prévoir au contraire que les arbres chez lesquels se manifeste un affaiblissement quelconque de la partie aérienne ou qui présentent quelques défauts d'affinité, donc en particulier les arbres virosés, drageonneront plus abondamment. De ce fait la contamination des drageons prélevés, sera toujours plus élevée que celle de la population d'arbres parmi lesquels ils auront été récoltés.

2° - La généralisation du virus dans la plante.

Un virus peut diffuser plus ou moins rapidement dans les pousses en cours de croissance. Certains greffons peuvent être sains. Cette diffusion variera suivant les maladies. Le virus de la Prolifération du pommier en particulier, parait ne pas atteindre tous les rameaux. L'époque de récolte des greffons et la température au cours des périodes qui précèdent cette récolte interviennent certainement aussi.

3° - L'influence du virus sur la reprise des greffes.

On sait que la Mosaïque du Prunier réduit la reprise des greffes (CHAMBERLAIN 1951)[2]. De ce fait, la fréquence des plants malades se trouvera réduite. Ilest à prévoir par contre, que parmi les plants sur lesquels le greffage a échoué, beaucoup seront contaminés. Il est dangereux de les réutiliser pour un greffage et surtout de les récupérer pour en faire des pieds-mères de porte-greffes.

.../...

Les valeurs de ces différents facteurs variables suivant les maladies, les années (facteurs climatiques), l'instruction et la conscience professionnelle de celui qui récolte le matériel à multiplier, sont difficiles à estimer. Dans cette étude nous admettrons, ce qui est le plus courant :

- que les virus n'influent pas sur la reprise des greffes;
- que leur action passe inaperçue à la récolte des greffons;
- qu'ils sont généralisés dans les greffons.

Définition - Symbole - Formules fondamentales.

Pour simplifier la présentation des calculs, nous allons définir quelques termes et présenter quelques symboles :

On appellera contamination C : la proportion de plants atteints par un ou plusieurs virus.

On appellera salubrité S : la proportion de plants non atteints par un ou plusieurs virus.

Si l'on distingue plusieurs virus : A, B, etc, ... on aura :

$$C_a \text{ et } C_{a,b}$$

respectivement la proportion de plants atteints par A d'une part et A B d'autre part;

$$S_a \text{ et } S_{a,b}$$

respectivement la proportion de plants non atteints par A d'une part, A et B d'autre part.

Nous utiliserons les indices s, g, pour désigner le porte-greffe ou sujet et le greffon; nous aurons ainsi :

$$S_s,\ C_s,\ S_g,\ C_g\ .$$

Les contaminations et salubrités initiales seront respectivement désignées par :

$$p_s,\ p_g,\ q_s,\ q_g.$$

La somme des éléments homologues C et S, p et q, sera toujours égale à 1 (La valeur 1 représente la totalité).

La combinaison par le greffage de deux éléments sains donne un plant sain.
La combinaison par le greffage de deux éléments malades ou d'un élément sain et un élément malade, donne un plant malade.

On aura donc les formules fondamentales :

Salubrité d'un lot de plants : $S = S_s \cdot S_g$ (1)

Contamination d'un lot de plants : $C = 1 - S_s \cdot S_g$ (2)

ETUDE DE L'INFLUENCE DES DIFFERENTS PROCEDES D'OBTENTION DES GREFFONS ET PORTE-GREFFES SUR LA CONTAMINATION GLOBALE.

1) - Le porte-greffe est sain.

Le virus est apporté par les greffons, la contamination des plants produits, est égale à celle des greffons et en moyenne à celle des arbres sur lesquels ont été prélevés les greffons .

Si suivant la pratique courante des pépinières, on reprend des greffons sur des arbres produits au cours des multiplications précédentes, la contamination demeurera constante et égale à la contamination initiale.

2) - Les greffons sont prélevés sur des arbres étalons.

On prélève toujours les greffons sur les mêmes arbres, la contamination des greffons est constante : $q_g = k$ = constante.
On aura d'une façon générale :

$$C = 1 - S_s \cdot q_g = 1 - k \cdot S_s$$

Si la contamination du porte-greffe est constante, la contamination des plants produits est constante.

3) - Les greffons sont pris sur des arbres produits antérieurement dans la pépinière.

La contamination va s'élever d'année en année, puisqu'il s'ajoute à chaque propagation, la contamination apportée par le porte-greffe.

L'arbre donneur de greffons peut être un arbre greffé un an avant, en particulier s'il s'agit de greffes de printemps ou si la végétation de la pousse formée à partir d'un écusson est assez vigoureuse et donne des anticipés. Plus souvent peut être s'agira-t-il de plants produits un an plus tôt. Les greffons seront

.../...

prélevés environ 2 ans après le greffage) qui n'ont pas été livrés au commerce parfois parce qu'ils ont été victimes d'un accident au cours des travaux de culture.

Nous examinerons l'évolution de la contamination en fonction du nombre de propagations, étant entendu, qu'il y aura une propagation tous les ans ou tous les 2 ans.

L'ordre de la propagation sera désigné par n : C^n et S^n, désigneront les valeurs correspondant à la n.ième propagation.

Etant donné que l'arbre définitif peut comprendre un intermédiaire et le greffon de la variété. Pour la n.ième propagation, nous distinguerons les différentes salubrités :

$$S^n_s \; , \; S^n_g \; , \; S^n_i \; , \; S^n_g \; , \; S^n_d .$$

d désignant le plant définitif, i le plant intermédiaire réduit au sujet et à l'intermédiaire , g et g' respectivement, les greffons d'intermédiaire et de la variété).

Etant donné le mode de prélèvement des greffons on a :

$$S^n_g = S^{n-1}_i \qquad S^n_{g'} = S^{n-1}_d$$

La formule (1) donnera :

$$S^n_i = S^n_s . S^n_g = S^n_s . S^{n-1}_i \qquad (3)$$

$$S^n_d = S^n_i . S^n_{g'} = S^n_i . S^{n-1}_d \qquad (4)$$

S'il n'est pas fait usage d'intermédiaire, la salubrité de l'arbre définitif est S^n_i

A - LE PORTE GREFFE EST CONTAMINE DE FACON CONSTANTE.

Cela se produit lorsque les porte greffes sont prélevés chaque année dans la même marcottière, ou obtenu des boutures, à partir des mêmes pieds-mères et qu'une certaine proportion de ces pieds-mères sont atteints d'un ou plusieurs virus, la contamination des porte-greffes ainsi produits sera constante, en supposant que les pieds-mères malades n'auront pas un vieillissement plus rapide que les plants sains. Si l'on renouvelle la marcottière ultérieurement en partant des plants de la première marcottière, le taux de contamination ne sera pas modifié.

.../...

Le cas où le porte-greffe est un semis pouvant présenter une certaine contamination (par exemple des semis de Merisier), se rapproche du cas étudié ici, avec cette différence que, la contamination des lots de graines variera d'une année à l'autre suivant leur origine.

La salubrité du porte-greffe étant constante on a :

$$S_s = q_s$$

(3) devient

$$S_i^n = q_s \cdot S_i^{n-1}$$

Pour les valeurs successives de n on obtiendra :

n = 1	$S_i^1 = q_s \cdot q_g$	$S_d^1 = q_s \cdot q_g \cdot q_g$,
2	$S_i^2 = q_s^2 \cdot q_g$	$S_d^2 = q_s^3 \cdot q_g^2 \cdot q_g$,
n	$S_i^n = q_s^n \cdot q_g$	$S_d^n = q_s^{n\frac{n+1}{2}} \cdot q_g^n \cdot q_g$,

Comme S s'exprime en fonction de puissances de q_s , q_g , q_g, nous pouvons établir le tableau des exposants de q_s , q_g q_g, exprimées par ((s)), ((g)) , ((g')).

n	S_i^n		S_d^n		
	((s))	((g))	((s))	((g))	((g'))
1	1	1	1	1	1
2	2	1	3	2	1
3	3	1	6	3	1
n	n	1	$n\frac{n+1}{2}$	n	1

.../....

Si nous prenons $q_s = q_g = q_{g'}$, nous obtenons le tableau :

n	$((S_i))$	$((S_d))$
1	2	3
2	3	6
3	4	10
n	n+1	$\frac{(n+1)(n+2)}{2}$

Remarques : 1°/ Les exposants obtenus pour la $n^{ième}$ propagation supposant que les greffons ont initialement la même contamination que le porte-greffe, sont égaux aux exposants obtenus pour la $(n+1)^{ième}$ propagation en admettant que les greffons de l'intermédiaire et de la variété sont sains au départ.

La forme de la courbe n'est pas modifiée.

2°/ Si l'on suppose $q_s = 1$ (le porte-greffe est sain$.

$$S_i^n = q_g = \text{constate}^n$$

$$S_d^n S = q_g \cdot q_{g'}$$

La contamination chez un arbre avec intermédiaire dont le sujet est sain, revient à la contamination d'un arbre sans intermédiaire, dont le sujet aurait au départ la contamination initiale du greffon d'intermédiaire.

La connaissance de ces exposants permet d'établir une courbe de l'évolution de la contamination au cours des propagations de la forme :

$$C = 1 - q^x$$

x est fonction de n et de la méthode utilisée.
Le graphique 1 montre ces courbes en supposant que initialement, seul le sujet est contaminé :

1° - dans le cas où il n'est pas fait usage d'intermédiaire (courbe A 1)
2° - dans le cas où il est fait usage d'un intermédiaire (courbeA2).

On peut également calculer combien il faut de propagations pour atteindre un certain degré de contamination étant donné la contamination initiale (Tabl.1).

B - LE PORTE-GREFFE EST UN DRAGEON.

Parmi les porte-greffes utilisés en pépinière, un nombre important proviennent de drageons récoltés dans les vergers. L'ensemble des drageons se trouvent prélevés sur des arbres de 10 à 25 ans. On peut admettre que les arbres âgés, fourniront plus de drageons que les plus jeunes; ils seront également moins contaminés que ces derniers qui proviennent de multiplications plus récentes. Pour les calculs nous avons fait l'hypothèse que la contamination moyenne des drageons prélevés sur l'ensemble des arbres de 10 à 25 ans, était égale à la contamination des drageons prélevés sur les arbres de 20 ans(*). Si l'on admet que l'état sanitaire n'a pas d'influence sur la production de drageons, le taux sera égal à la contamination des arbres produits 20 ans plus tôt. En fait nous l'avons dit, les arbres malades drageonnent généralement plus abondamment et les taux de contaminations que nous obtiendrons, seront certainement sous-évalués.

Puisqu'il faut disposer de drageons, nous supposerons que pendant 20 ans, les plants ont été produits suivant la technique envisagée en A et que seulement à partir de la 21ème année, on a utilisé des drageons prélevés sur les arbres produits 20 ans plus tôt et ainsi de suite pour les années suivantes.

Les formules (3) et (4) donneront :

$$S_i^n = S_s^n \cdot S_g^n = S_s^n \cdot S_i^{n-1}$$

Pour n inférieur ou égal à 20 : $S_s^n = q_s$

n supérieur à 20 : $S_s^n = S_d^{n-20}$

S'il n'y a pas d'intermédiaire : $S_d^n = S_i^n = S_i^{n-20} \; S_i^{n-1}$

S'il y a un intermédiaire : $S_d^n = S_d^{n-20} \; S_i^{n-1} \; S_d^{n-1}$

.../...

(*) - Le choix de l'année de référence pourrait donner lieu à des calculs auxquels nous ne nous sommes pas livrés. Il faudrait tenir compte de la contamination des arbres suivant leur âge et de la distribution de la proportion de drageons récoltés en fonction de l'âge des arbres.

S va encore s'exprimer par des puissances des salubrités initiales q_s, q_g, $q_{g'}$:

Nous allons établir comme précédemment, la table des exposants $((s))$, $((g))$, $((g'))$.

1°) Plants sans intermédiaire :

n	S_s^n		S_i^n		
	((s))	((g))	((s))	((g))	
1	1	0	1	1	
2	1	0	2	1	
3	1	0	3	1	
:	.	.	.	.	
.	.	.	.	.	
20	1	1	20	1	Changement de technique
21	1	1	21	2	
22	2	1	23	3	
23	3	1	26	4	
..	.	.	..	.	
30	10	1	75	11	
..	..	..	..	..	
40	20	1	230	21	
41	21	2	251	23	
42	23	3	274	26	
43	26	4	300	30	
..	..	.	...	..	
50	75	11	650	86	
..	..	..	...	..	
60	230	21	2170	251	
..	....	..	....	...	
63	300	30	2995	330	
..	...	..	...	...	

2° - Plants avec intermédiaire.

	S_s^n			S_i^n			S_d^n		
n	((s))	((g))	((g'))	((s))	((g))	((g'))	((s))	((g))	((g'))
1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
2	1	0	0	2	1	0	3	2	1
3	1	0	0	3	1	0	6	3	1
..	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20	1	0	0	20	1	0	210	20	1
21	1	1	1	21	2	1	231	22	2
22	3	2	1	24	4	2	255	26	4
23	6	3	1	30	7	3	285	33	7
24	10	4	1	40	11	4	325	44	11
25	15	5	1	55	16	5	380	60	16
..	..	.	.	..	..	.	...	..	..
30	55	10	1	240	56	10	1125	250	56
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
35	120	15	1	700	121	15	3570	715	121
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
40	210	20	1	1560	210	20	9465	1580	210
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

A partir de la 22 e multiplication, on voit apparaitre un accroissement linéaire de l'exposant ((s)) du sujet qui traduit le changement de technique, l'exposant ((s)) du plant produit ne s'accroît plus linéairement. A partir de la 42e multiplication apparait un accroissement plus rapide que proportionnellement d' ((s)) du sujet. L'accroissement de ((s)) du plant produit s'accroît encore plus rapidement. Si l'on donne à q_s, q_g et $q_{g'}$ la même valeur, les exposants ((s)), ((g)), ((g')) s'additionnent et là encore la valeur de l'exposant pour la $n^{ième}$ propagation est égal à la valeur de l'exposant à la (n + 1) ième propagation si l'on prend $q_g = 1$, $q_{g'} = 1$. C'est à dire si les greffons sont initialement sains. La forme de la courbe n'est donc pas modifiée.

Le graphique représente les courbes obtenues pour $p_s = 0,01$ en n'utilisant pas d'intermédiaire (courbe BI) et en utilisant un intermédiaire (courbe B_2).

C - UTILISATION DE BOUTURES OBTENUES A PARTIR DE PLANTS DEJA GREFFES.

Le bouturage de pousses récupérées sur des plants déjà greffés, présente un danger encore plus considérable.

.../...

Dans la pépinière où nous avons pu observer cette pratique, le porte-greffe était le myrobolan blanc. Les boutures étaient produites à partir du bois de taille récupéré en hiver sur des plants greffés l'été précédent. Par la suite ces boutures étaient greffées avec un intermédiaire et une variété dont les greffons étaient prélevés sur des plants produits précédemment dans la même pépinière.

Hypothèse n°1.

On admettra que si un greffon malade est placé sur un porte-greffe sain, la totalité des boutures récupérées sur ce porte-greffe sont contaminées.

La salubrité du sujet est donc égale à la salubrité du plant intermédiaire produit à la multiplication précédente :

$$S_s^n = S_i^{n-1}$$

La formule (3) nous donne :

$$S_i^n = S_s^n \cdot S_g^n = (S_i^{n-1})^2$$

La salubrité s'exprimant toujours par des puissances de q_s, q_g, q_g nous ferons le tableau des exposants :

	S_i^n			S_d^n		
n	((s))	((g))	((g'))	((s))	((g))	((g'))
1	1	1	0	1	1	1
2	2	2	0	3	3	1
3	4	4	0	7	7	1
4	8	8	0	15	15	1
..	..	..	..	..	..	..
n	2^{n-1}	2^{n-1}	0	$2^n - 1$	$2^n - 1$	1

Remarque :

Si l'on suppose que la contamination initiale des greffons est égale à celle du porte-greffe, la contamination à la n ième propagation est égale à celle de la (n + 1) ième en supposant que les greffons sont initialement sains.

.../...

Si l'on fait usage d'un intermédiaire, la contamination à la n ième propagation est pratiquement égale de la $(n + 1)$ ième propagation en ne faisant pas usage d'intermédiaire.

L'évolution de la contamination avec l'usage de cette technique est représentée par les courbes C^1 (sans intermédiaire) C^2 (avec intermédiaire).

Hypothèse n°2.

Il est sans doute peu vraisemblable que le greffage d'un écusson malade, soit capable pendant la période comprise entre le greffage et le prélèvement des boutures de contaminer la totalité d'un plant.

Nous supposerons donc qu'une fraction $\frac{1}{k}$ seulement est contaminée.

Théorie de la contamination des plants produits avec des boutures prises sur des porte-greffes déjà greffés (contamination partielle par un greffon malade).

Sur un lot de sujets sains, on place des greffons dont la contamination est C_g. Si la présence d'un greffon malade suffit à contaminer l'ensemble du sujet au moment du prélèvement des boutures, la proportion de boutures contaminées sera C_g. Si seulement $\frac{1}{k}$ des boutures sont contaminées par un greffon, la contamination des boutures sera :

$$C = \frac{C_g}{K}$$

La salubrité sera :

$$S = \frac{K-C}{K}{}^{g} = \frac{(K-1)\ S}{K}{}_{g}$$

Si maintenant le lot de sujet présente une salubrité S_s, la salubrité des boutures sera :

$$S = S_s \cdot \frac{(K-1) + S_g}{K}$$

Les sujets utilisés pour la n ième propagation sont les boutures obtenues à partir des sujets de la $(n-1)$ ième propagation, qui viennent d'être greffés avec les greffons d'intermédiaire, prélevé sur la $(n-2)$ ième propagation, ils ont la salubrité : $S_g = S_i^{n-2}$.

...../...

La salubrité du sujet sera :

$$S_s^n = S_s^{n-1} \cdot \frac{(K-1) + S_i^{n-2}}{K}$$

d'où =

$$S_i^n = S_s^{n-1} \cdot \frac{(K-1) + S_i^{n-2}}{K} \cdot S_i^{n-1} \quad : \quad (5)$$

$$S_d^n = S_s^{n-1} \cdot \frac{(K-1) + S_i^{n-2}}{K} \quad S_i^{n-1} \cdot S_d^{n-1} \quad (6)$$

Etablissons le tableau des valeurs de S_s^n et $S_{i'}^n$,

n	S_s^n	S_i^n
1	q_s	$q_s \cdot q_g$
2	$q_s \cdot \frac{(K-1)+q_g}{K}$	$q_s^2 \cdot q_g \cdot \frac{(K-1)+q_g}{K}$
3	$q_s \cdot \frac{(K-1)+q_g}{K} \cdot \frac{(K-1)+q_s \cdot q_g}{K}$	$q_s^3 \cdot q_g \left\{\frac{(K-1)+q_g}{K}\right\}^2 \cdot \frac{(K-1)+q_s \cdot q_g}{K}$

S_s^n s'exprime sous la forme :

$$S_s^n = q_s \cdot A_0 \cdot A_1 \cdot A_2 \cdot \ldots\ldots \cdot A_{n-2}$$

avec $$A_0 = \frac{(K-1)+q_g}{K}$$

$$A_n = \frac{(K-1)+S_i^n}{K}$$

En exprimant sous la forme logarithmique les formules :

$$S_i^n = S_s^n \times S_i^n - 1 \qquad S_d^n = S_i^n \times S_d^{n=1}.$$

$$\log S_i^n = \log S_i^{n-1} + \log q_s + \log A_0 + \log A_1 + \ldots + \log A_{n-2}$$

$$\log S_d^n = \log S_i^n + \log S_d^{n-1}$$

Pour suivre l'évolution de la contamination, nous serons ainsi obligé de calculer les valeurs de proche en proche.

L'évolution de la contamination est représentée par les courbes D 25 (contamination des boutures à 25%) et D 10 (contamination des boutures à 10%)

Le tableau suivant indique selon les techniques, après combien de propagations, les différents niveaux de contaminations sont atteints en supposant les greffons initialement sains et la contamination initiale du porte-greffe égale à 0,001, ou 0,1 %

Niveaux de contamination.

	10%	50%	90 %	95 %	99 %.
A1	107	701	2326	3026	4652
A2	15	38	68	78	96
B1	33	51	61	64	68
B2	15	24	35	35	37
C^1	8	11	13	13	14
C2	7	10	12	12	13
D_{25}	12	16	20	21	22
D_{10}	16	23	28	29	30

ETUDE DE LA FORMATION DES COMPLEXES DE VIRUS.

Les opérations de greffage risquent également de faire apparaître des complexes de virus, en particulier, l'action conjuguée de 2 virus latents lorsqu'ils sont isolés, peut provoquer une maladie grave.

Théorie de l'apparition des complexes.

Considérons m virus A, B, C, ... M.
Soit les contaminations initiales du porte-greffe pour ces différents virus p_{as}, P_{bs}, ... P_{ms} ., auxquels correspondent les salubrités

q_{as}, q_{bs} .... q_{ms} .

.../...

Les contaminations et salubrités initiales pour le greffon seront :

$p_{ag'}$ $q_{ag'}$ p_{bg}, q_{bg}, ... p_{mg}, q_{mg}.

Pour la n ième propagation, désignons par (A), (B), ... (M), la fréquence des plants portant respectivement les virus A ,B, ... M, isolément ,

de même (A+B), (A+C), ... (C+M).... les fréquences des plants portant les différentes combinaisons de deux virus et ainsi jusqu'à (A+B+C+....+M) la fréquence de la combinaison des m virus. (0) représente la fréquence des plants sains.

Soit : $f(q_s, q_g, q_{g'})$ la fonction issue de (4) permettant de calculer la salubrité suivant la technique paratiquée :

$$S = f(q_s, q_g, q_{g'})\ f(1-p_s, 1-p_g, 1-p_{g'})$$

La fréquence des combinaisons qui ne contiennent pas A, y compris (0) est :

$$S_a = f(1-p_{as}, 1-p_{ag}, 1-p_{ag'})$$

La fréquence des combinaisons n qui ne contiennent ni A ni B, y compris (0)

est $S_{a,b} = f(1-p_{as} - p_{bs}, 1-p_{ag} - p_{bg}, 1-p_{ag'} - p_{bg'})$

ainsi de suite jusqu'à la fréquence des plants sains (0).

$$(0) = S^n_{a,b,\ldots m} = f(1-p_{as}-p_{bs} \ldots - p_{ms}, 1-p_{ag}-p_{bg} - \ldots \ldots - p_{mg}, 1-p_{ag'} - p_{bg'} - \ldots - p_{mg'})$$

Ces différentes valeurs vont nous permettre de calculer la fréquence du complexe complet A+B+C+ .... + M. connaissant la technique utilisée et les contaminations initiales.

Ceci permet d'envisager de nouveaux calculs.

Exemple : Si l'on considère 2 virus A et B nous aurons :

$S_a = (B) + (0)$ $\quad S_b = (A) + (0)$ $\quad S_{a,b} = (0)$

Comme $(A) + (B) + (0) + (A+B) = 1$

$$(A+B) = 1 - S_a - S_b + S_{a,b}$$

Si la méthode de propagation entraine à la n ième propagation une salubrité exprimée, en supposant les greffons initialement sains, par :

$$S^n = q_s^x = (1-p_s)^x.$$

$$(A+B) = 1 - (1-p_{as})^x - (1-p_{bs})^x + (1-p_{as} - p_{bs})^x.$$

En prenant $p_{as} = p_{bs} = 0,001$ on obtient la courbe représentée par le graphique 2 pour la technique A^2, (contamination constante du porte-greffe et usage d'un intermédiaire).

CONCLUSION

Ces études théoriques ont l'intérêt de permettre de comparer l'influence de certaines pratiques de pépinières sur la dégradation de l'état sanitaire des plants produits.

On déconseille d'une façon générale, de reprendre les greffons sur des plants produits précédemment. Cette action est dangereuse en soi, en effet, si on reprenait toujours les greffons sur des arbres étalons peu contaminés que l'on utilise, l'une ou l'autre méthode pour se procurer les sujets, l'état sanitaire se dégraderait assez lentement.

Elle a cependant relativement peu de conséquence, si on ne fait pas usage d'un intermédiaire. En effet, en prenant le taux de contamination initiale du porte-greffe de 0,001, il faut plus de 3.000 propagations pour atteindre le niveau de contamination 0,95, en pratiquant la première technique, il suffit de 12 à 78 avec les autres.

Remarquons aussi que les courbes sont proches les unes des autres pour les premières propagations, puis se distinguent nettement entre la 7e et la 15e. A ce moment après avoir effectué quelques propagations de plus la contamination passe d'un niveau relativement acceptable à un niveau déplorable.

Nous pensons précisément qu'étant donné l'industrialisation de la production des plants fruitiers, certaines de ces techniques ont été pratiquées depuis une cinquantaine d'années, soit 25 propagations et que nous nous trouvons pour certaines maladies, au moment de la phase explosive. La visite de certaines cultures vient étayer ce point de vue.

En fait ces dangers se trouveraient réduits si chaque année une certaine fraction des plants, était produite à partir de matériel prélevé sur des arbres étalons et sur des pieds-mères aussi sains que possible. Le reste des plants de la pépinière pourraient alors être obtenus sans grand risque en prélevant les greffons sur les pieds produits les années précédentes à partir de greffons provenant des arbres étalons.

L'état sanitaire, mis à part, les risques de contamination par vecteur, serait alors stable.

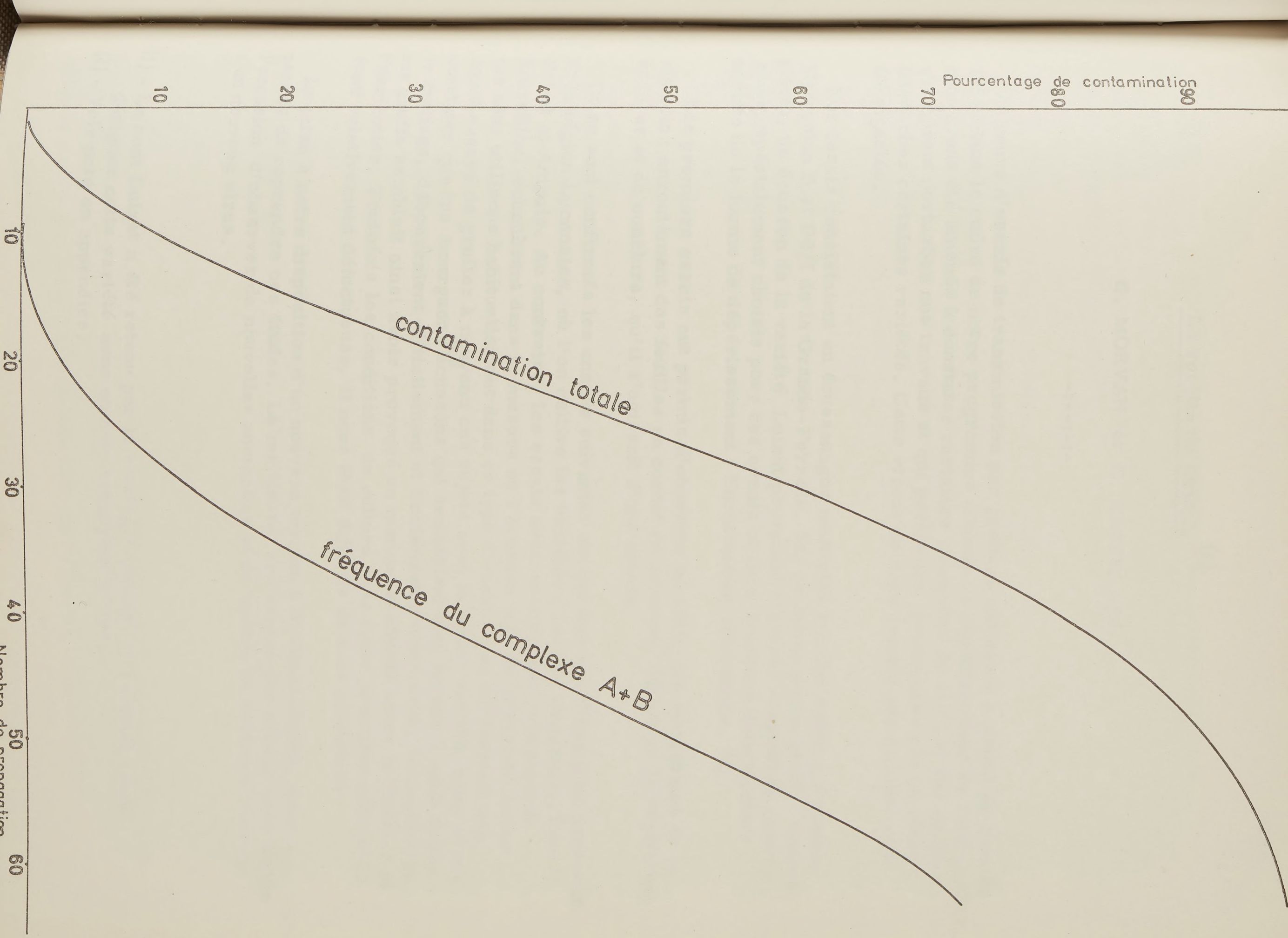
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

(1) - GILMER et BRASE - Amer. Soc. Hort. Sci. Proc. 75, p.188-194,1960.

(2) - CHAMBERLAIN , ATKINSON , HUNTER - N. Zealand J. Sci. Techno. Sec. A. 33, p.1-14, 1951.

graphique 1

Pourcentage de contamination
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
C2
C1
D25
D10
B2
A2
A2
B1
A1
1
2
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Nombre de propagations


Pourcentage de contamination
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Nombre de sensibilisation
10
20
30
40
50
60
contamination totale
fréquence du complexe A+B

Nous avons ainsi constaté que chaque fois qu'un écusson de la variété Luizet était placé sur le même porte-greffe qu'un écusson d'Abricotier du Roussillon (généralement de la variété Rouge du Roussillon), et que le premier réussissait à donner une pousse, celle-ci était normale la première année, mais au départ de la végétation, l'année suivante, elle présentait une végétation tout à fait anormale.

Les bourgeons donnaient naissance à des rosettes de petites feuilles de 2 cm environ à pétiole très court , de teinte très claire avec une concavité accusée tournée vers le haut. Cet aspect se maintenait intégralement jusqu'au début de juin. Il se produisait alors, une certaine croissance qui atténuait ces symptômes, mais le développement de la pousse de Luizet restait très limité.

La pousse de la variété Rouge du Roussillon au contraire, se développait normalement et contrastait fortement avec la précédente.

Ce symptôme a été observé ces deux dernières années, que l'inoculation ait transmis ou non l'Enroulement chlorotique. Il est habituel en effet, que le greffage d'une certaine proportion des rameaux greffons d'arbres atteints d'Enroulement chlorotique, ne donne pas lieu à une transmission d'Enroulement.

Dans un autre essai, des boutures de P 8/I furent greffées avec divers écussons d'arbres considérés comme sains, dont un abricotier de la variété Rouge du Roussillon. En raison de l'époque du greffage et de l'utilisation de boutures enracinées l'année même, les écussons n'ont pas repris. Au printemps suivant, toutes ces boutures furent regreffées avec la variété Luizet (1). Tandis que l'écusson Luizet s'est développé normalement sur les boutures ayant porté des greffons provenant d'arbres du Lyonnais, un seul écusson de Luizet s'est développé parmi les boutures qui avaient reçu en premier, un greffon Rouge du Roussillon. Sur les autres tantôt les écussons ne se sont pas soudés, tantôt quoique soudés, l'extrêmité des bourgeons s'est détachée. Ceci rappelait exactement ce qui s'était produit lors des premiers essais lorsque nous avons voulu regreffer avec Luizet, des porte-greffes un an après l'inoculation avec Rouge du Roussillon.

Ces observations nous amènent à conclure que :

La variété Rouge du Roussillon, héberge à l'état latent, un virus qui parait indépendant de celui de l'Enroulement chlorotique de l'Abricotier,qui

.../...

---

(1) - Il s'agit d'écussonnage à oeil poussant en Mai avec des greffons récoltés l'hiver et conservés au froid.

contrairement à celui-ci est généralisé dans les rameaux greffons et qui provoque chez la variété Luizet, l'apparition de rosette, de petites feuilles en coupe.

La sensibilité des diverses variétés à ce virus, sa fréquence dans les plantations, les possibilités d'interaction avec l'Enroulement chlorotique, sont des points qui sont maintenant à l'étude.

NOTE - Parmi les formes de dépérissement de l'Abricotier, nous avons dégagé (MORVAN 1956) (1), une forme appelée, dérèglement de la végétation caractérisée essentiellement, par le départ de la végétation en hiver. Depuis, il parait nécessaire de distinguer le dérèglement de végétation, avec enroulement des feuilles en cornet - qui correspond à ce qui est appelé conformément aux propositions de R. BOVEY - Enroulement chlorotique (cf. C.R. - Journée Nationale de l'Abricotier - PERPIGNAN 1961, p.100). Cette maladie est une virose. C'est cette forme que nous avons obtenue au cours de nos essais de transmission. A côté il existe une forme de dérèglement de la végétation sans enroulement dont la nature est encore mal précisée.

---

(1) - Annales des Epiphyties - p. 211-227 - 1956.

1

2

3

ÉTUDES DE VIROLOGIE APPLIQUÉE

G. Morvan (1-2) - J. Albouy (3)

N° 5 - 1964

PURIFICATION DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DE LA TULIPE

Mme J. ALBOUY.

(Station Centrale de Pathologie Végétale)

-:-

La mosaïque de la tulipe ou "breaking" maladie très anciennement connue cause une panachure caractéristique sur les fleurs des plantes atteintes, panachures se présentant sous forme de décoloration en stries des pétales, et une mosaïque plus ou moins accentuée sur les feuilles. L'agent infectieux est le virus I de la tulipe ou virus du breaking.

Nous avons procédé à l'extraction et à la purification du virus à partir de feuilles ou de bulbes de tulipes hâtées variété Rose Copland présentant les symptômes caractéristiques de la panachure.

Extraction et Purification.

50 g de feuilles congelées sont broyées au Turmix en présence de 100 ml de tampon tris-acide citrique (pH 7,5) contenant du saccharose (0,5 M), quelques gouttes de bisulfite de sodium sont ajoutées afin de prévenir toute oxydation.

La suspension est filtrée sur étamine; le filtrat est congelé puis décongelé.
Une première centrifugation à faible vitesse (15 mn à 1500g), permet d'éliminer les gros débris cellulaires.

Le surnageant est soumis à 4 cycles de faible et forte centrifugation (réalisée dans ultracentrifugeuse Spinco).

Schéma des opérations :

Filtrat clarifié à 1500 g pendant 15 minutes :

Surnageant — Culot éliminé

1) 8000 g pendant 15 min. ←

Le culot de la dernière ultracentrifugation est repris et homogénéisé dans 3 ml d'eau distillée.

Surnageant — Culot éliminé

On laisse reposer la suspension 2h à 4°.

2) 70.000 g pendant 1h1/2

3 fois

Une dernière centrifugation à 1500 g permet d'obtenir un jus très clair.

Surnageant — culot

Examen au Microscope Electronique.

L'observation de la préparation en coloration négative a montré la présence d'un assez grand nombre de particules creuses se présentant sous la forme de batonnets flexueux ayant 13 mμ de large et dont les plus longs mesurent 600 mμ environ.

Ces particules correspondent au virus de la mosaïque de la tulipe.

Des inoculations à d'autres tulipes ont été réalisées.

Nous proposant d'étudier ce virus, ce travail préliminaire a été effectué afin d'obtenir un matériel purifié et concentré suffisamment pour réaliser un anti serum.

- Cliché électronique de Madame MICHON.

ETUDE D'UNE MALADIE A VIRUS DU CONCOMBRE

par D. SPIRE (+)

Au cours de l'année 1963 est apparue dans la région Orléanaise une maladie à virus du type mosaïque dont les symptômes ne concordaient pas avec ceux que provoquent habituellement le Virus I du Concombre.

La plante très peu rabougrie dans son ensemble, présentait soit une panachure intense, soit une mosaïque vert-sombre.

Ces symptômes nous ont permis de rapprocher cette affection de celle décrite par Ainsworth en 1935 sous le nom de "CUcumber green mottle mosaïc", par Johnson sous le nom de virus 3 et 4 du Concombre et par SMITH sous le nom de Cucumis virus 2 et 2 A.

Ce virus, apparenté à la Mosaïque du Tabac, n'avait pas encore été décrit en France et nous nous proposons d'en faire une étude sommaire.

Symptomatologie :

Les principaux symptômes de cette virose sur le Concombre sont les suivants :

La souche "normale" produit une mosaïque vraie, avec des plages vert-foncé s'opposant au vert plus clair des parties du limbe foliaire non atteint. Des déformations importantes (cloques, boursouflures accusent encore le contraste entre les deux couleurs et permettent une distinction entre ce virus et le virus I du Concombre (mosaïque jaune) (photo 3).

La souche "aucuba" donne une attaque de la plante plus caractéristique. Les premiers symptômes consistent en taches blanches ou jaunes, étoilées, prenant naissance autour des nervures (photo 1), elles sont rapidement suivies d'une Mosaïque Aucuba, jaune pâle, ou blanche. Ces plages claires se réunissent petit à petit pour ne plus offrir qu'un aspect blanc uniforme de la feuille où les nervures apparaissent en filigrane vert sur fond décoloré (photos 4 et 5).

Le fruit normalement formé présente une mosaïque argentée bien caractéristique.

(+) avec la collaboration technique de J. BERTRANDY, M.C. GRISON et de Mme MICHON en ce qui concerne le Microscope électronique.

Indexage :

Nous avons inoculé mécaniquement le virus extrait de feuilles de Concombre virosé à toute une gamme de plantes comprenant en particulier des Solanées et des Chenopodiacées.

Nicotiana tabacum, Nicotiana glutinosa, Petunia hybridum, n'ont présenté aucun symptôme après l'inoculation, démontrant par là, l'absence totale de virus I du Concombre dans le jus infectieux. Aucune autre Nicotianée (N.alata, langsdorfii, paniculata, longiflora, megalosiphon, rustica, ambalema) n'a présenté le moindre signe d'affection.

L'absence de lésions locales sur Chenopodium quinoa a permis de différencier ce virus, du virus de la Mosaïque du Concombre.

Par contre, et contrairement aux affirmations de certains auteurs, des lésions chlorotiques ont été obtenues sur Chenopodium amaranticolor, et Chenopodium mullifidum a réagi à l'inoculation par des lésions locales rouges et irrégulières. (photo 2)

Mis à part ces deux Chenopodium, seules les plantes de la famille des Cucurbitacées réagissent de façon généralisée au virus, et il faut citer, à côté du Concombre, le Melon qui développe une mosaïque.

Sérologie :

Un antisérum a été réalisé à partir d'un extrait ultracentrifugé de Concombre virosé.

Cet extrait, administré avec adjuvant à un lapin par trois injactions de 2 ml à une semaine d'intervalle, nous a fourni un antisérum puissant ayant une excellente réaction sur lame avec le virus issu du Concombre. Il est à constater que cet antisérum n'a qu'une réactivité faible envers le virus de la Mosaïque du Tabac.

Cependant le virus du Concombre réagit positivement avec un antisérum de Mosaïque du Tabac.

La réaction sérologique croisée existe donc bien entre les deux virus.

Microscopie électronique - purification.

Nous avons réalisé plusieurs purifications du virus suivies d'observation au microscope électronique.

Le procédé le plus simple a été réalisé de la façon suivante : les feuilles de Concombre, préalablement congelées sont broyées dans un tampon tris-citrique O, 1MpH 7,5 avec quelques gouttes de bisulfite Après clarification, le surnageant est mélangé à 0,05 g par ml. de charbon activé. Ce mélange est agité occasionnellement pendant une demie heure, puis filtré sur papier Whatman n°1.

.../...

Le liquide incolore obtenu est débarrassé des traces de charbon par une centrifugation lente, puis soumis à un cycle de centrifugation et d'ultracentrifugation de 10 000 tours/minute et 30 000 tours/minute dans une Ultracentrifugeuse "Spinco" modèle L. Le culot de cette dernière centrifugation repris dans un tampon tris pH 7,5 (1/50è du volume initial) est homogénéisé et soumis à une dernière centrifugation à 10 000 tours/minute pendant 1/4 d'heure pour éliminer les impuretés restantes.

L'observation au microscope électronique nous a permis de constater la présence de particules identiques d'aspect à celles du virus de la Mosaïque du Tabac : bâtonnets rigides de 15 de largeur (photo 6).

La transmission de ce virus s'effectue uniquement par voie mécanique. On peut se demander alors quelle source contaminante est à l'origine de cette nouvelle infection des Concombres de l'Orléanais. La seule hypothèse actuelle (non vérifiée) est que ce virus, très résistant, se soit introduit avec des graines dont les téguments extérieurs étaient infectés, graines provenant des Pays-Bas où le virus a été décrit il y a que ques années.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

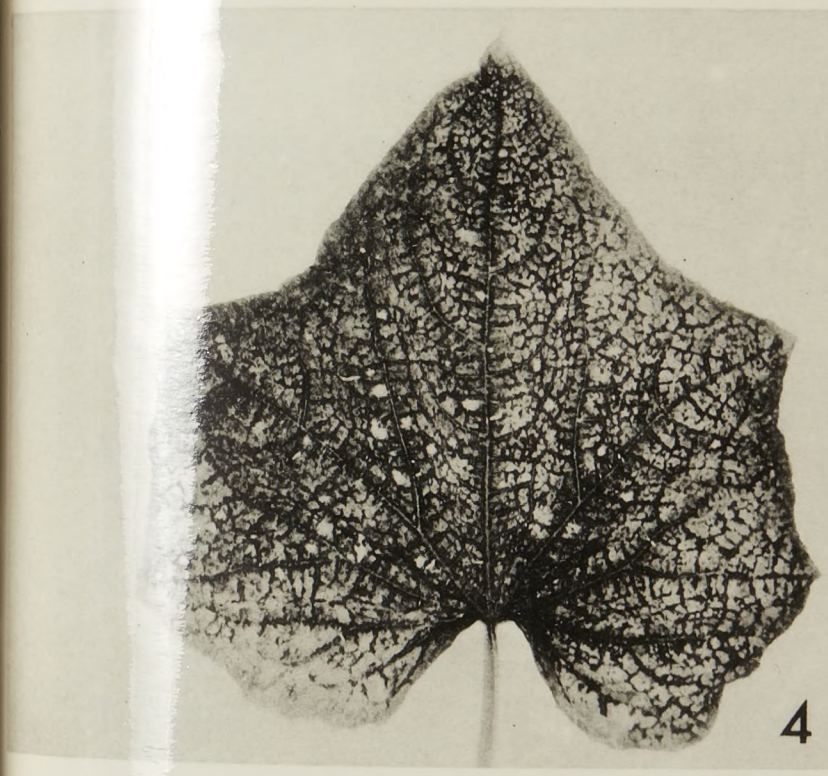
AINSWORTH - 1935 - Mosaic diseases of the cucumber - Ann . Appl.Biol. 22 55-67

VAN KOOT Y. & Van DORST H.S.M. - Virus Ziekten van de Konkourmet in Nederland - T. Pl. Ziekten 65 (1959) 257-271.

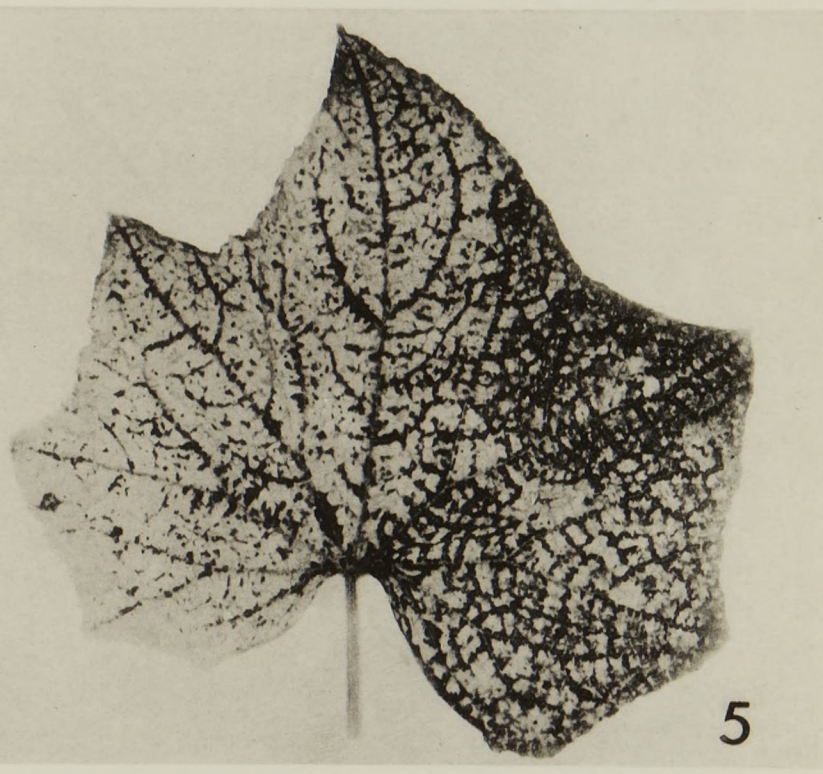
1

2

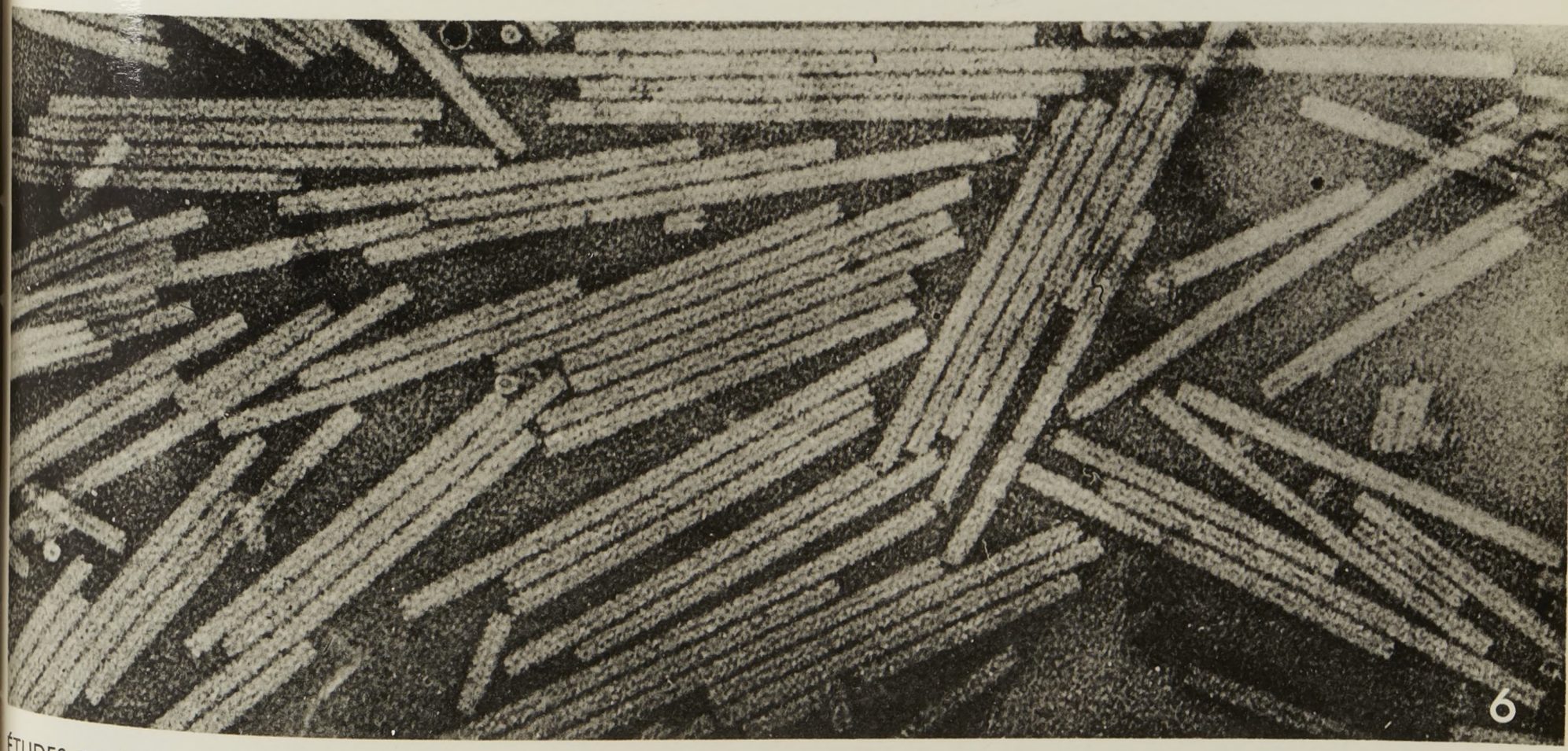
3



4



5



6

ÉTUDES DE VIROLOGIE APPLIQUÉE
D. Spire

N° 5 - 1964
Planche I

Extraction de l'acide nucléique infectieux du virus Y de la Pomme de terre.

D. SPIRE et J. BERTRANDY.

-:-:-

Nous avons cherché dans cette étude à isoler de Nicotiana tabacum infecté par le virus Y de la Pomme de terre, un acide nucléique infectieux et à comparer le pouvoir infectieux de cet acide nucleique à celui de la particule - virus complète.

Une première expérience a été réalisée en extrayant directement par le phénol, la totalité des acides nucleiques de feuilles de Solanum demissum systématiquement envahies par le virus Y. Les essais suivants ont été faits avec le virus purifié.

Méthodes et essais:

10 g. de feuilles virosées sont mis à congeler, puis broyés à froid dans un mélange contenant 20 ml de phénol saturé d'eau et 10 ml d'une solution à 40 mg/ml de bentonite dans un tampon tris-citrique 0,1M pH 7,5.

La bentonite est préparée selon la méthode décrite par Fraenkel - Conrat et Singer. Le mélange est alors homogénéisé à 4° pendant 4 minutes dans un mortier, puis filtré sur étamine et agité encore pendant un même laps de temps. La solution est ensuite centrifugée pendant quelques minutes à 3000 t/min. On reprend alors 3 fois la phase supérieure aqueuse dans de l'éther froid, pour supprimer toute trace de phénol et on élimine enfin l'éther par simple évaporation.

Il est possible de concentrer une partie de la solution nucleique obtenue par une précipitation dans de l'alcool à 95°. Le précipité obtenu est alors remis en solution dans un tampon tris-citrique 0,1M pH 7,5.

L'inoculation des acides nucleiques est effectuée après avoir frotté les feuilles de la plante test avec une solution de bentonite à 6 mg/ml.

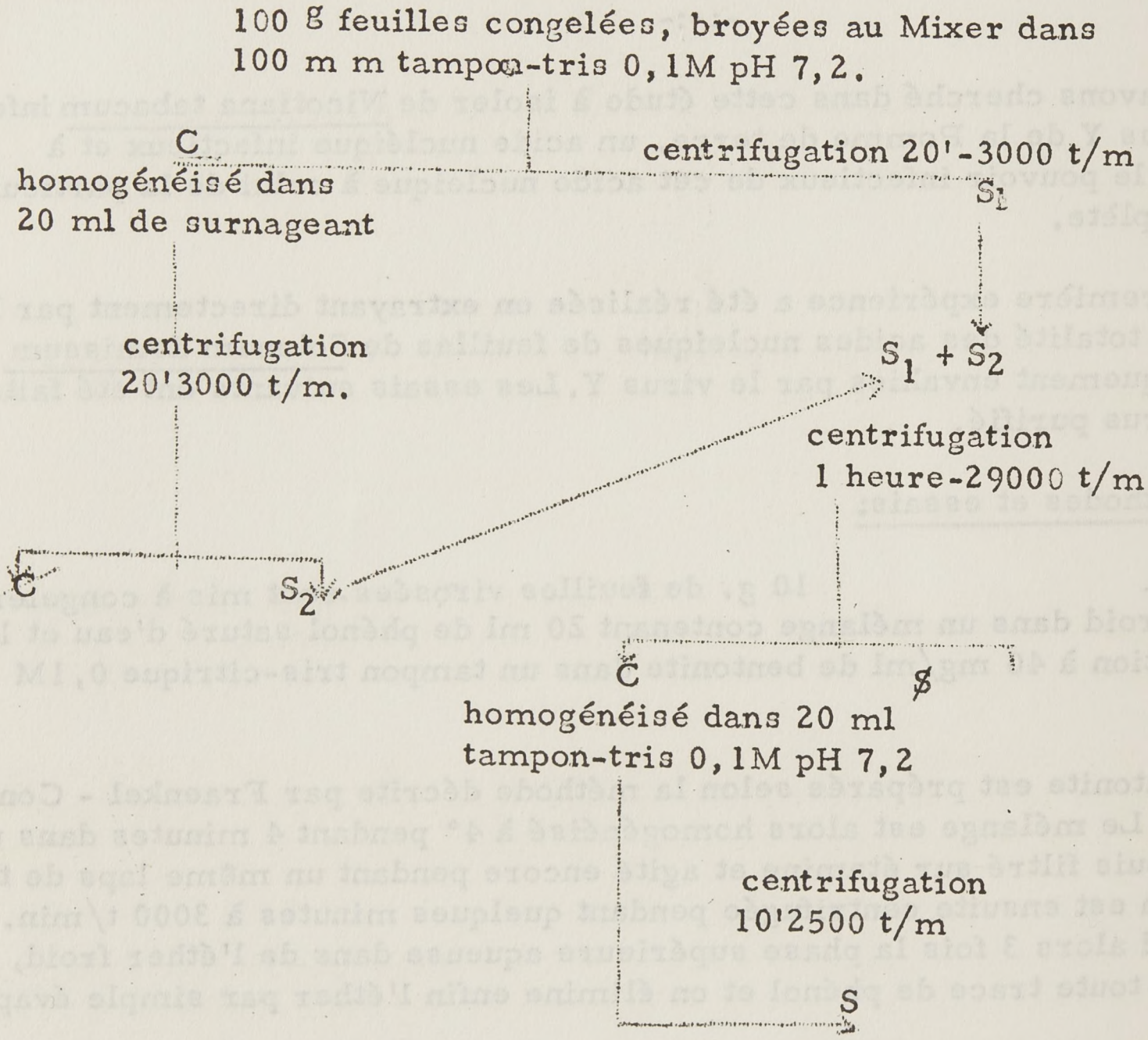
L'inoculation sur Chenopodium amaranticolor donne en moyenne de lésions locales par feuille inoculée les valeurs suivantes :

	virus complet	acide nucleique	acide nucleique concentré
Nombre de lésions.	4	7	4

.../...

Les expériences ont été reprises après avoir concentré suffisamment le virus Y, le matériel de départ étant la Pomme de terre.

L'extraction et la concentration du virus ont été effectuées selon le schéma suivant :



Le surnageant final observé au microscope électronique a montré de très nombreux filaments flexueux.

Une partie de cette solution a été conservée comme témoin, le reste soumis à une extraction par le phénol selon la méthode décrite par Fraenkel Conrat et Singer, avec apport, de bentonite (40mg/ml) dans le milieu d'extraction

Une partie de l'acide nucleique extrait est concentré par l'alcool.

Les trois solutions : virus complet, acide nucleique et acide nucleique concentré ont été inoculés sur Chenopodium amaranticolor, après traitement des feuilles avec une solution à 6 mg/ml de bentonite.

Toutes les feuilles de 5 Chenopodium ont été inoculées avec chacune des solutions, on obtient les résultats suivants :

.../...

	virus complet	acide nucleique	acide nucleique concentré.
Nombre total de lésions	914	721	672
Moyenne par plante	182	144	134

Conclusion :

Ces résultats nous montrent :

1) que la concentration de l'acide nucleique par l'alcool n'a pas permis d'augmenter le pouvoir infectieux de la solution ;

2) que le rapport du pouvoir infectieux de l'acide nucleique viral à celui du virus complet est voisin de l'unité.

Ce rapport est élevé si l'on se rappelle que l'acide nucleique du virus de la Mosaïque du Tabac, n'exprime seulement qu'1/10e du pouvoir infectieux de la particule complète.

Il faut cependant émettre des réserves sur la validité d'un test quantitatif qui utilise le nombre de lésions sur Chenopodium même si des facteurs tels que l'âge ou le niveau des feuilles sont éliminés par inoculation de toute la plante.

Il n'en reste pas moins que le virus Y est une particule virale dont l'acide nucleique s'extrait facilement et possède un pouvoir infectieux voisin de celui que procure la particule complète.

BIBLIOGRAPHIE

H. FRAENKEL CONRAT, B. SINGER et A. TSUGITA - Purification of Viral B W A by means of , Bentonite - Virology 14, 54-59, 1961.

B. SINGER et H. FRAENKEL CONRAT - Effects of Bentonite on infectivity and stability of TMV-RNA - Virology 14, 59-66, 1961.

RECHERCHES CONCERNANT L'EXTRACTION ET LA PURIFICATION DES VIRUS X Y et S DE LA POMME DE TERRE

D. SPIRE - M.C. GRISON - J.BERTRANDY

Nous nous proposons dans cet article de réunir quelques expériences relatives aux méthodes d'extraction et de purification de certains virus de la Pomme de terre.
Les résultats, encore très fragmentaires, devraient pouvoir aider, le diagnostic sérologique.

1) Purification sans agrégation du virus X de la Pomme de terre.

De nombreux articles font état de purification partielle du virus X, mais signalent la tendance de ce virus à s'agréger formant des faisceaux de particules difficiles à observer. Récemment encore, CORBETT a recherché différentes méthodes pour purifier ce virus sans agrégation et a obtenu les meilleurs résultats à l'aide de charbon activé.

Notre méthode est différente et se fonde sur les propriétés d'adsorption de certaines argiles. C'est au cours d'études sur l'inoculation de virus en présence de bentonite que nous nous sommes aperçus de son pouvoir de clarification. Un extrait de feuilles de Pomme de terre auquel on ajoute un volume égal d'une solution de bentonite à 25 mg/ml devient parfaitement limpide après une centrifugation de 5 minutes à 2300 t/m.

Nous avons réalisé une expérience préliminaire en utilisant le virus de la mosaïque du tabac, afin de déterminer une quantité optima de bentonite à rajouter à l'extrait de plante avant une centrifugation lente à 2300 t/m.
40 à 60 mg/ml de bentonite provoquait une chute importante du pouvoir infectieux, dû à un entraînement des particules par l'argile.
5 à 25 mg/ml permettait de retrouver la presque totalité du virus dans un surnageant très clarifié.
1 à 5 mg/ml ne clarifiait pas suffisamment la solution.

METHODES

La meilleurs extraction du virus X a été effectuée à l'aide d'une bentonite à 10mg/ml de la façon suivante : Des feuilles de Pomme de terre (var. Esterlingen) infectées par le virus X sont mises à congeler à -20°C. Elles sont ensuite broyées dans un tampon tris0,1M pH 8,4 contenant 1‰ de bisulfite de sodium et 10 mg/ml de

.../...

bentonite. L'extrait obtenu, filtré sur étamine, est centrifugé à 2300 t/m pendant 10 minutes.

Au surnageant vert clair de cette centrifugation on réajoute une solution de bentonite à 25 mg/ml dans un tampon tris 0,1M pH 8,4 (1/5è du volume de la solution à clarifier).

Une nouvelle centrifugation de cinq minutes à 2300 t/m donne alors un surnageant limpide.

Celui-ci est soumis ensuite à une centrifugation de 10 minutes à 12000 t/m dans une centrifugeuse Servall, et, le culot éliminé, recentrifugé 1 h30 à 29000 t/m dans le rotor 30 d'une ultracentrifugeuse Spinco. Le culot de cette dernière centrifugation est alors repris et homogénéisé dans 1 ml de tampon tris 0,1M pH 7,5 et débarrassé de ses impuretés par une dernière centrifugation à faible vitesse.

La solution obtenue a été examinée au microscope électronique après coloration négative à l'acide phosphotungstique. Elle a montré de très nombreuses particules filamenteuses parfaitement dispersées (photo 1).

Ces particules, de 10 mμ de largeur environ présentent en leur milieu un canal très fin décelable sur les photos (2,3,4).

DISCUSSION

La bentonite obtenue après traitement selon la méthode décrite par Fraenkel-Conrat permet d'entraîner une certaine quantité d'éléments cellulaires par une centrifugation à très faible vitesse. Cette vitesse permet de libérer dans le milieu les particules dans qu'elles s'agrègent. Il est néanmoins nécessaire d'avoir affaire à des virus qui ne sédimentent pas trop facilement.

Nous avons en effet réalisé des expériences d'extraction avec betonite de quelques autres virus. Si la méthode parait intéressante dans le cas de virus parasphérique (une extraction du virus 1 du concombre par cette méthode a donné par inoculation de nombreuses lésions locales sur Chenopodium quinoa). Elle semble beaucoup plus délicate à employer avec des virus à forme filamenteuse tel que le virus Y ou le virus S de la Pomme de terre qui avec des concentrations faibles de bentonite précipitent dans leur quasi totalité dès la première centrifugation.

2) Essai de purification des virus S et Y de Pomme de terre

Le problème de l'extraction est à la base même des échecs que l'on obtient lorsque l'on essaye de purifier ces virus. Dans le cas du virus S, et plus encore dans celui du virus Y, une centrifu-

.../...

gation à la vitesse de 8000 t/m élimine déjà la presque totalité des particules.

Si l'on rajoute alors à une solution non clarifiée du virus, une quantité de bentonite correspondant à 4 mg/cc, une centrifugation de 10 minutes à 3000 t/m fait précipiter le virus, et le surnageant clair ne présente plus de réaction sérologique avec un antisérum homologue.

Nous avons donc recherché un moyen susceptible de garder en suspension ces virus particulièrement instables.

L'adjonction au milieu d'extraction de produits tensio-actifs nous a permis d'obtenir quelques résultats en facilitant la remise en suspension des particules.

Le détergent que nous avons étudié est le Laurylsulfate de sodium employé à la concentration de 0,05 à 0,1%.

Nous avons pu constater dès les premières expériences que le virus restait en solution à des vitesses de centrifugation plus élevées, mais que les surnageants de ces centrifugations gardaient plus longtemps aussi leur couleur verte, ceci probablement à cause d'une certaine solubilité de la chlorophylle dans cette solution.

Nous avons vérifié à chaque prise d'essai, la présence du virus étudié par réaction sérologique (après avoir montré que le Laurylsulfate ne créait pas de précipité anormal).

A une même vitesse et pendant une durée de centrifugation identique les résultats suivants ont été obtenus avec le virus S (intensité de la réaction sérologique).

Durée 10 minutes

t/m	3000	5000	7000	9000	11000	13000	15000
tampon tris	++	+++	++	+	+	+	+-
tampon tris + Laurylsulfate	+++	++++	+++	++	+-	+-	+-

.../...

Durée 20 minutes

t/m	3000	5000	7000	9000	I1000	I3000	I5000
tampon tris	+++	++	++	+	+	+	+
tampon tris + Laurylsulfate	+++	+++	+++	++	++	++	++

L'adjonction de laurylsulfate permet donc une solubilisation meilleure des particules virales.

Il faut cependant constater qu'à des vitesses élevées les différences obtenues s'amenuisent et que la méthode solubilise simultanément d'autres éléments cellulaires qu'il faut éliminer par la suite pour une observation au microscope électronique.

Nous avons associé ensuite pour extraire et concentrer le virus S, une technique appliquée par CORBETT au virus X : l'utilisation du charbon activé. Ce charbon est mélangé au jus clarifié à la dose de 50 mg/ml et l'ensemble est agité occasionnellement pendant 20 minutes. On filtre ensuite sur papier Whatman n° 1.

Le liquide récolté est alors soumis à une centrifugation de 4000 t/m afin d'éliminer les particules charbonneuses restantes, puis subit une centrifugation d'une demi heure à 12000 t % m avant d'être concentré dans une ultracentrifugeuse Spinco à la vitesse de 20000 t/m pendant 1 h30. Le culot de ce dernier cycle est homogénéisé dans un tampon tris 0,1M pH 7,5 et centrifugé à faible vitesse pour éliminer les impuretés.

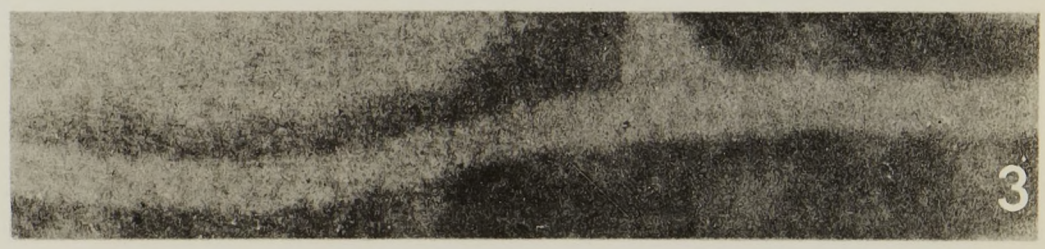
Ce dernier surnageant a présenté une très forte réaction sérologique et montrait au microscope électronique de très nombreuses particules filamenteuses (environ 13 mμ) sur un fond cependant assez granuleux (photo 5).

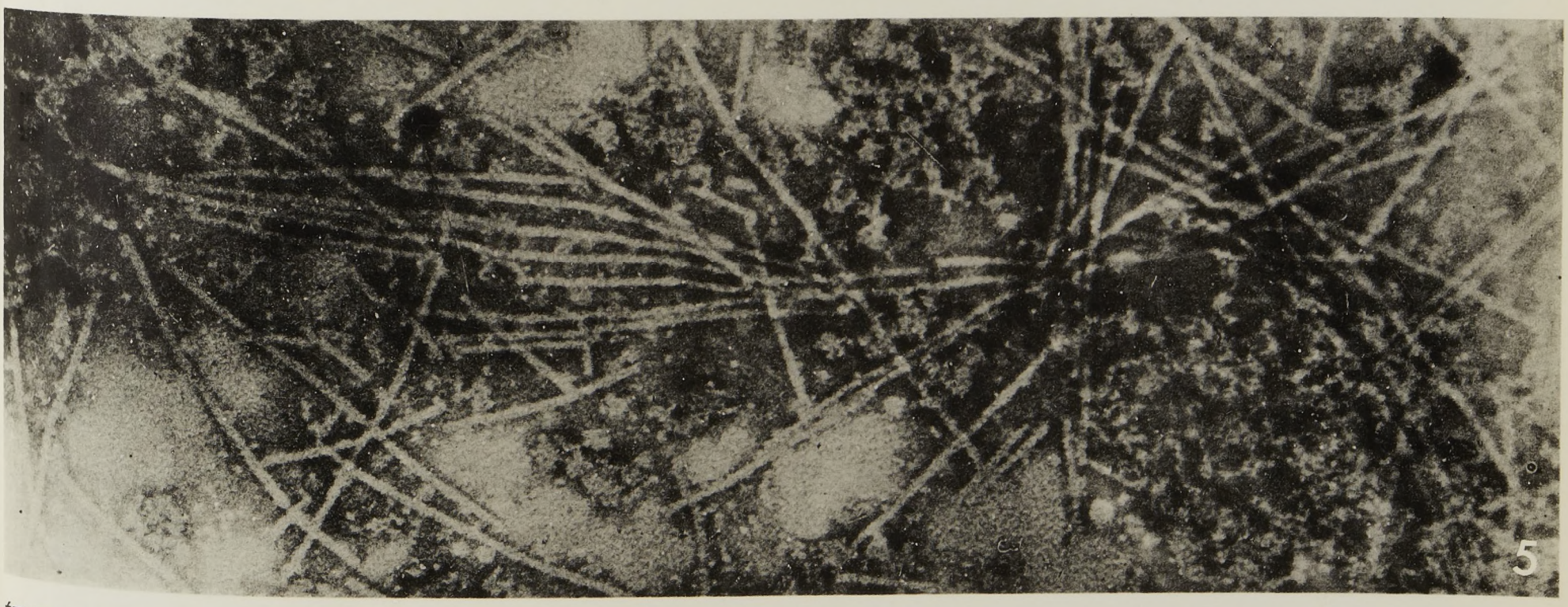
La méthode parait donc intéressante et peut permettre pour d'autres virus, instables et difficiles à purifier, un meilleur rendement dans l'extraction et la concentration des éléments pathogènes Elle devrait être appliquée à l'obtention de virus particulièrement difficile à extraire (Mosaïque du chou-fleur, virus 1 du concombre).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CORBETT - Virology 15, p. 8-15, 1961

FRAENKEL CONRAT et al. - Virology 14, p. 54-59, 1961





OBSERVATIONS DE QUELQUES MALADIES A VIRUS SUSCEPTIBLES D'ETRE TRANSMISES PAR CICADELLES EN FRANCE :

M.T. COUSIN

Diverses maladies à virus transmises par Cicadelles sont connues depuis fort longtemps en Amérique, Australie et en Europe Centrale. Récemment les auteurs anglais s'intéressent à leur tour à ce groupe de virus. En France ces maladies étaient totalement ignorées jusqu'aux travaux de SCHVESTER qui mit en évidence la transmission de la flavescence dorée de la vigne par une Cicadelle : Scaphoïdeus littoralis. En 1959, PECAUD, MESSIAEN et LATERROT découvraient le Stolbur de la tomate dans le Vaucluse. En 1962 nous observions des maladies à virus de type jaunisse dans la région parisienne. Récemment POCHARD notait à son tour sur différentes variétés d'aubergines des symptômes très voisins de ceux décrits par Valenta (1961). Ces observations revèlent l'importance de ces maladies en France. Nous nous proposons ici de préciser les principaux caractères de 2 souches de virus de type Jaunisse sur tomates et de donner un aperçu sommaire sur les maladies à virus, connues en France, susceptibles d'être transmises par Cicadelles.

En Tchéchoslovaquie BLATTNY (Prague 1954) et VALENTA (Bratislava 1961), ont décrit les symptômes provoqués par les maladies à virus de type Stolbur sur tomate. D'après VALENTA les symptômes externes sont la résultante de 3 facteurs : Sensibilité de la variété, souche de virus (il en note plus de 40) et enfin facteur lié au milieu ambiant. Nous précisons ici que le terme souche n'est utilisé que pour la commodité du langage, les liens de parenté entre ces différentes souches n'étant pas établis. BLATTNY (1954) définissait 2 types principaux de symptômes sur tomates: Type Sud ou gothique (S) type Nord ou rosette (N) : ces 2 types de symptômes étant essentiellement sous la dépendance du facteur souche de virus. En 1962 on observait dans la région de Monthléry, les 2 types de symptômes décrits par BLATTNY. Après conservation, par bouturages et greffages successifs au cours de l'hiver, on reproduisit au champ les symptômes observés initialement, quelle que soit la variété de tomate utilisée. Il semble donc que nous soyons en présence de 2 virus ou de 2 souches de virus différents, dont les liens de parenté ne pourront être établis que par les tests de prémunition croisée.

La localisation même de ces 2 souches semble conforme à la description de BLATTNY. La souche (S) était jusqu'à ces dernières années la seule connue dans le midi. Pour la lère fois à la fin de l'été 1962 nous l'avons observée dans la région Parisienne, mais il s'agissait plutôt de cas isolés. La souche (N) au contraire semble la plus fréquente dans la région parisienne. Nous avons noté en 1962 de nombreuses plantes présentant des anomalies de ce type. La maladie apparut à nouveau dans la région de Monthléry et d'Orléans au voisinage de champs de pied mères de chrysanthèmes et pour la première fois dans le midi au cours de l'été 1963, été exceptionnel par l'abondance des précipitations. Les 2 types de symptômes ayant

.../...

été obtenus, en un même lieu, à la suite d'inoculation par greffage, sur la même variété, il semble donc que ces 2 souches soient sous la dépendance écologique de leurs vecteurs.

Dans certains cas ces maladies à virus peuvent prendre une extension considérable : PECAUD notait au cours de l'arrière saison 1962 ; 50 % de tomates infectées par le virus du Stolbur (S) en Tunisie. On observait au cours de l'été 1963 un champ entier de tomates présentant les symptômes décrits par BLATTNY sous le nom de Stolbur (N). Toutefois les plantes infectées se présentent le plus souvent à l'état dispersé dans la nature et la répartition des plantes malades au champ fournit une première indication sur le mode de transmission.

Ces 2 souches de virus se distinguent tant par leur localisation géographique que par les symptômes qu'elles produisent sur tomates : port général des plantes infectées, augmentation de la pigmentation anthocyanique et présence de phyllodies. Les tomates infectées par le Stolbur (S) ont un port erigé. On n'observe pas d'épaississement de tiges, les feuilles prennent un aspect raide, cassant. Les folioles s'incurvent vers la face supérieure et les pétioles se recourbent vers la base. Ce phénomène est beaucoup plus accentué en ce qui concerne la souche Sud, l'accumulation d'amidon étant accrue.

Dans le cas de la souche (N), au contraire, la plante prend un aspect buissonnant par suite du développement anormal des bourgeons axillaires. Les modifications histologiques qui en résultent ont été étudiées en détail l'an dernier. On assiste à une prolifération cellulaire intense qui se manifeste par une hyperplasie du liber interne et un départ accru de bourgeons axillaires. Des observations analogues ont été faites en 1933 par SAMUEL (G), BALD (J.C) et EARDLEY (C.M) concernant le Big Bud de la tomate en Australie et en 1961 par RASA (A) et ESSAU (K) au sujet de Curly top et de l'Aster yellow de la tomate en Amérique. Les modifications histologiques résultant de l'infection par la souche (S) sont totalement différentes. Il n'existe pas de prolifération cellulaire. Par contre les tissus libériens présentent des nécroses assez abondantes. Dans les 2 cas ces modifications anatomiques affectent essentiellement le liber.

L'augmentation de la pigmentation anthocyanique est une des caractéristiques essentielles de ce type de maladie à virus. Les auteurs signalent une flavescence suivie d'une intense pigmentation anthocyanique : ce qui confirmerait l'hypothèse d'une compétition initiale entre la synthèse du virus et celles des anthocyanes. Toutefois la flavescence est peu accentuée dans la nature. Par contre l'augmentation de la pigmentation anthocyanique en fin de végétation est telle que les pousses terminales prennent une coloration violette intense dans le cas de la souche (S), légèrement plus faible en ce qui concerne la Souche (N). Les conditions ambiantes influent considérablement sur la synthèse des anthocyanes En serre les plantes sont totalement flavescentes. On n'observe

jamais la coloration violette si remarquable au champ. Les plantes prélevées dans la nature et placées en serre perdent rapidement leur aspect violacé. Ces observations coïncident assez bien avec la description de BLATTNY qui définissait, pour ces deux souches, une forme d'hiver flavescente en serre, et une forme d'été violacée dans la nature.

Les 2 souches se distinguent essentiellement par les anomalies qu'elles provoquent sur les pièces florales. Les phyllodies n'apparaissent pas sur tomates infectées par la souche (N). On assiste seulement à un avortement des pièces florales entraînant la stérilité de la plante. Les modifications tératologiques résultant de l'infection par la souche (S), ont un aspect très particulier. Le calice prend un développement exagéré, les sépales restent presque entièrement soudés. Lorsqu'on dissèque une fleur infectée on observe une réduction des pétales à l'état de petites lames virescentes, un avortement des étamines et une légère hypertrophie du pistil. En fin de végétation il apparait souvent, à l'extrémité de l'axe floral, des papilles provenant d'une prolifération des ovules. Ces fleurs anormales sont portées à l'extrémité de rameaux érigés. Une attaque précoce entraîne la stérilité totale de la plante. Si les fruits se forment ils sont considérablement déformés, les parois placentaires épaissies, et les graines incapables de germer. Enfin sur les variétés de tomates à fruits allongés on observe la formation d'une coque blanche.

Alors que les maladies à virus de type mosaïque, affectent l'ensemble de la plante, l'infection n'est ici généralisée que si l'inoculation a eu lieu précocement au champ. L'un des traits les plus caractéristiques de ces affections virales consiste en la localisation des symptômes à une partie seulement de la tomate si l'infection est relativement tardive.

Les caractères décrits précédemment, concernant les maladies à virus de type Stolbur sur tomate : répartition dispersée des plantes infectées au champ, prolifération cellulaire, augmentation du taux d'anthocyane, apparition de phyllodies, enfin localisation des symptômes sur une partie seulement du végétal, constituent autant de critères qui suggèrent la présence d'une maladie à virus transmise par Cicadelles. Nous donnerons ici un aspect sommaire des principales affections virales existant en France, transmises ou susceptibles d'être transmises par cicadelles.

.../...

Maladies à Virus	Flavescence dorée de la Vigne	Phyllodie du trèfle blanc	Virus de type Stolbur	Prolifération du Pommier	Chlorantie des Crucifères
Vecteurs	Scaphoïdeus littoralis	Aphrodes bicinctus Euscelis plebejus	Hyalesthes obso letus Aphrodes bicinctus Euscelis plebejus Maceosteles spp	Calligypona pellucida	indéterminé
Auteurs signalant la transmission	SCHVESTER (D) (1963)	CHIYKOWSKI (L.N) (1961) MUSIL (M) (1962) POSNETTE (A.F) (1963)	BLATTNY (L.N) (1954) MUSIL (M) (1961) POSNETTE (A.F) (1963) SUHOV (K.S.) et VOVK (A.M) (1949) VALENTA (1961)	BLATTNY (L) (1963)	

Pour les 2 premières, les transmissions sont effectuées avec un taux important de succès : les vecteurs étant capables d'effectuer leur cycle entier sur la plante à inoculer. En ce qui concerne les maladies à virus de type Stolbur, les transmissions semblent difficiles à réaliser de tomate à tomate : cette plante ne constituant pour les vecteurs cités qu'une hôte de relai sur lequel ils sont incapables d'effectuer leur cycle entier. Récemment BLATTNY signale un cas de transmission du virus de la prolifération du pommier par Calligypona pellucida. Aucun essai n'a encore été entrepris concernant la chlorantie du Colza.

Les modifications tératologiques constituent un des traits les plus remarquables de ces affections virales. Sous l'action du virus les fleurs font retour à l'état foliaire initial : la transformation est totale dans le cas de la phyllodie du trèfle ; un axe foliaire se développe à l'emplacement de chaque fleur de l'inflorescence qui prend un aspect bien particulier. Dans le cas de la prolifération du pommier on assiste à une évolution des pièces florales très comparable à celle précédemment décrite dans le cas de la souche Sud du Stolbur sur Tomate. Le calice est hypertrophié et demeure seul visible au cours du développement de l'axe floral. On observe un développement anormal des stipules sur les feuilles situées à la base du corymbe. Toutefois les modifications teratologiques les plus curieuses furent observées sur crucifères. D'après EMBERGER (L) et CHADEFAUD (M) la fleur de crucifère, en apparence très simple, serait une inflorescence contractée. Sous l'effet du virus les axes restés à l'état latent, se développent anormalement. Ce phénomène, décrit l'an dernier, par MORVAN (G), a été observé cette année à la fois sur Colzas d'hiver et sur porte-graines de radis situés à leur voisinage. L'axe prolifèrant peut être suivant les cas, central ou latéral. On assiste à un soulèvement du pistil au dessus de la plante : phénomène désigné par BOS (L) (1963) sous le nom d' Apostasie(Apo : sans, Stasis : arrêt de développement). Les étamines avortent chez le Colza et donnent naissance à de petits axes foliaires dans le cas du radis. Les pétales restent à l'état de lames foliacées. On assiste parfois, en fin de végétation, à un autre type de modifications florales. Les pièces florales prolifèrent et forment de nombreuses papilles à l'extrémité du rameau. Ces phénomènes présentent une analogie remarquable avec les proliférations décrites précédemment en ce qui concerne la souche Sud du Stolbur. D'autres anomalies florales furent observées cet été sur Tagetes : (Rose d'Inde Mistral jaune soufre) et sur chrysanthèmes, mais la nature virale de ces modifications tératologiques n'a pas encore été mise en évidence. On ne saurait toutefois accorder à ces anomalies florales une valeur de diagnostic, car leur apparition n'est que saisonnière. Elles n'affectent souvent qu'un faible pourcentage de plantes infectées. Toutefois l'observation de ces phyllodies, jointe à la présence des critères précédemment cités, suggère la présence de maladies à virus transmises par Cicadelles.

.../...

Les seules méthodes de transmission ont été jusqu'ici réalisées au moyen de la greffe, de la cuscute et de l'insecte vecteur. La transmission mécanique de plante à plante s'est révélée négative. Des essais d'extraction d'ARN au phénol furent réalisés par Mme SHENCK sans résultat. Cette absence de transmission mécanique explique les difficultés rencontrées au cours de l'étude de ces viroses. Toutefois des essais positifs de transmission mécanique d'insecte à insecte permettent d'espèrer que le vecteur fournira le matériel d'étude de ces virus.

Nous remercions vivement Melle WEINSTEIN pour les planches de phyllodie et Mr. MORVAN pour les documents concernant la prolifération du pommier.

Planche (1) : Symptômes de Stolbur sur tomate.

1 - Extrémité d'un rameau infecté par le Stolbur : souche Sud
2 - Souche Nord : idem
3 - Souche Sud : faisceau de liber interne nécrosé x 190
4 - Bouquet floral : souche Sud et fleur saine témoin
5 - Témoin : faisceau de liber interne x 190.
6 - Fruit prélevé sur un pied infecté par le Stolbur Souche Sud.
7 - Graines récoltées sur ce fruit (petites, dépourvues d'anneau mucilagineux, incapables de germer) et sur fruit sain.
8 - Fruit sain - Témoin.

Planche (2) :

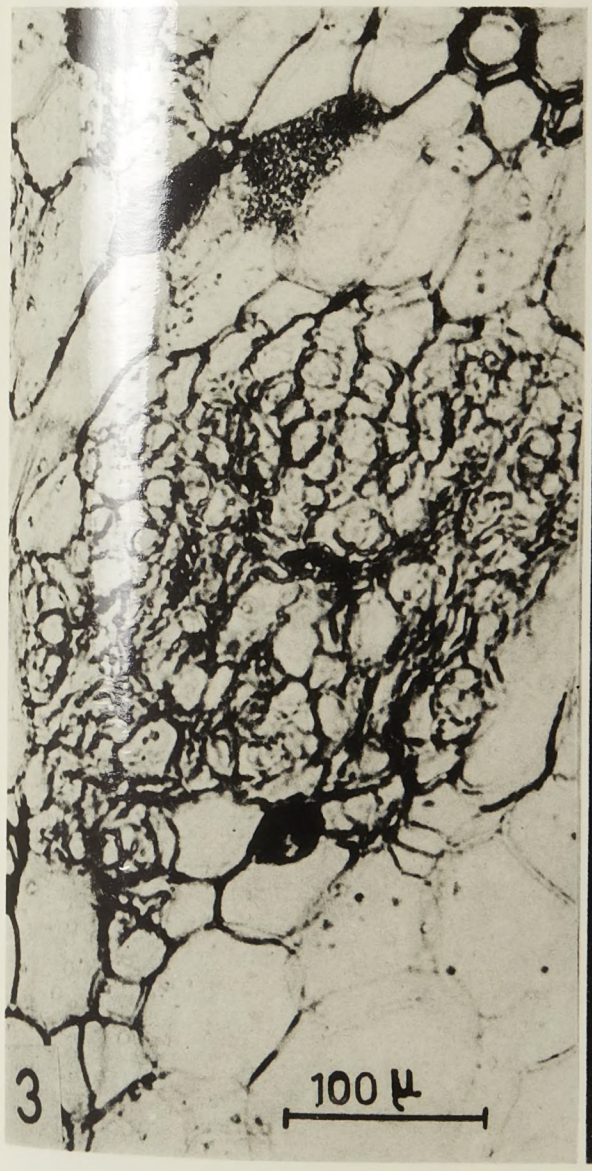
Anomalies florales observées sur Tomate infectée par le virus du Stolbur : Souche Sud.

Planche (3) :

Chlorantie des Crucifères. Phyllodie du Trèfle blanc.
Prolifération du Pommier.

1

2

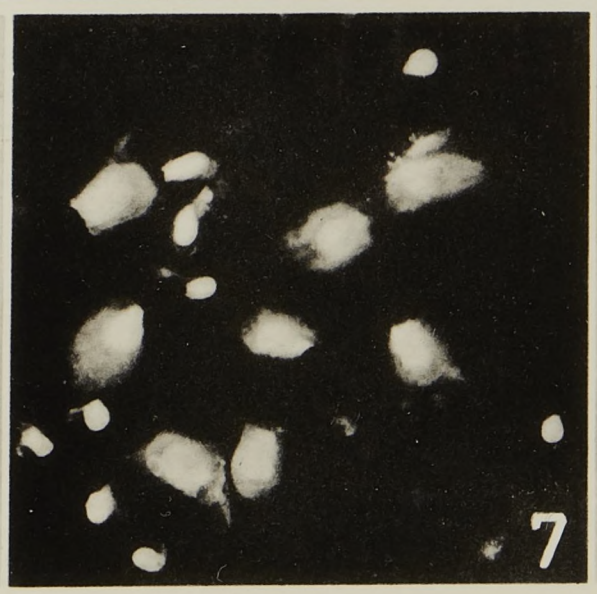


3

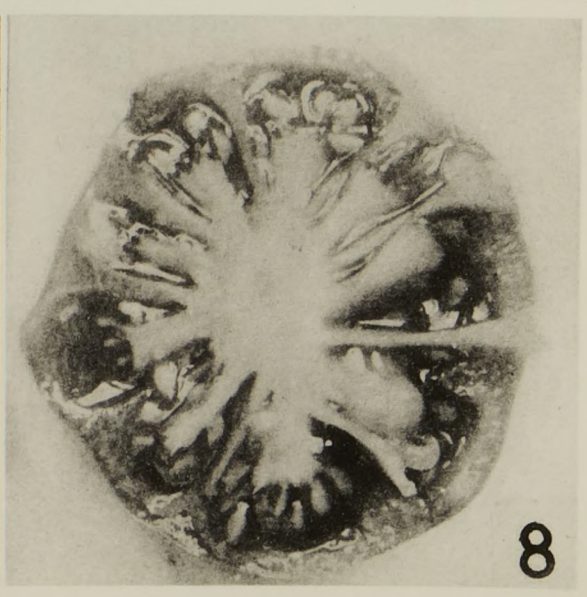
4

5

6



7

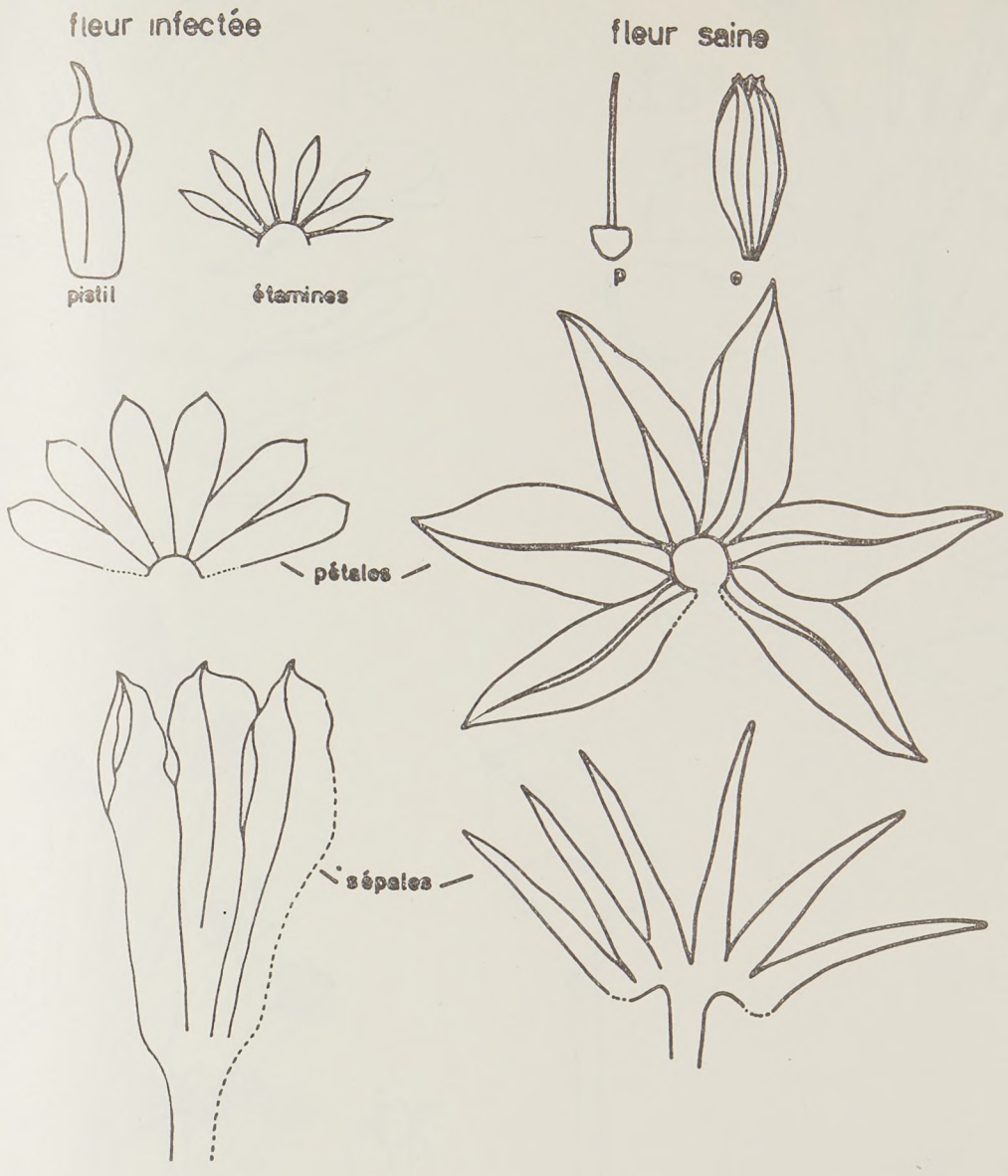


8

ÉTUDES DE VIROLOGIE APPLIQUÉE
M.T. Cousin

N° 5 - 1964
Planche I

A1



A2

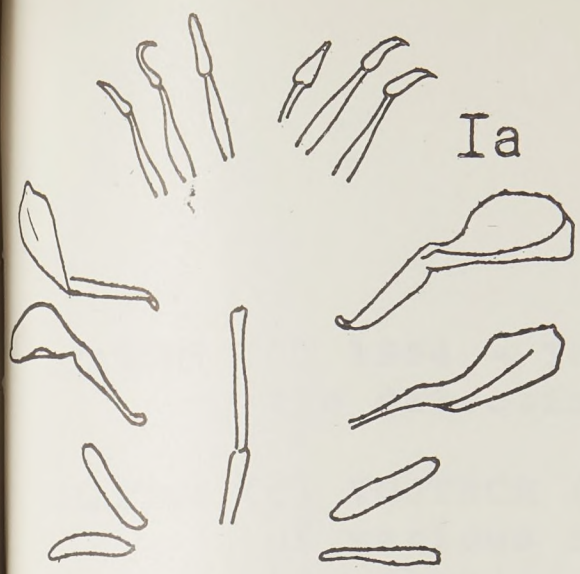
Anomalies florales observées sur Tomate infectée par le virus du STOLBUR : Souche Sud.

A Hypertrophie du Calice et modification des pièces florales

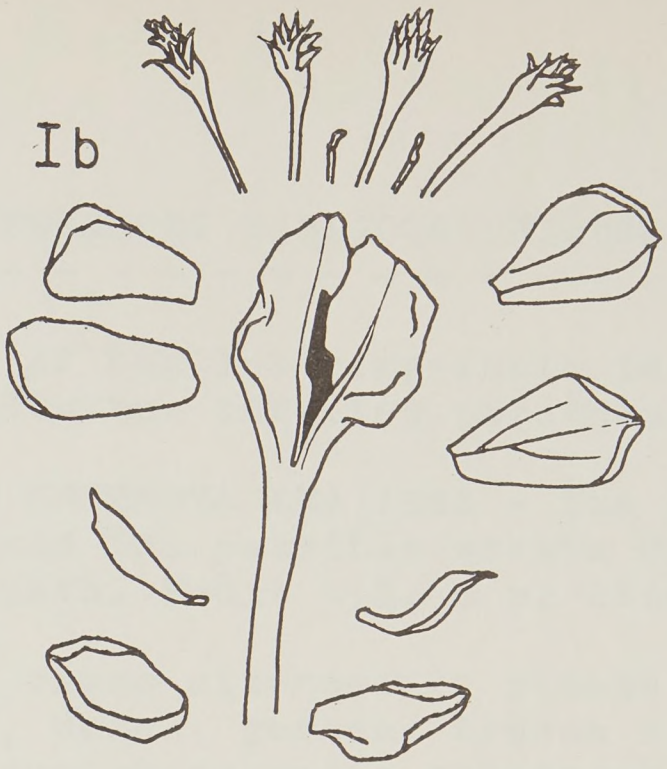
1 : Dissections d'une fleur infectée et saine

2 : Vue externe du bouquet floral infecté

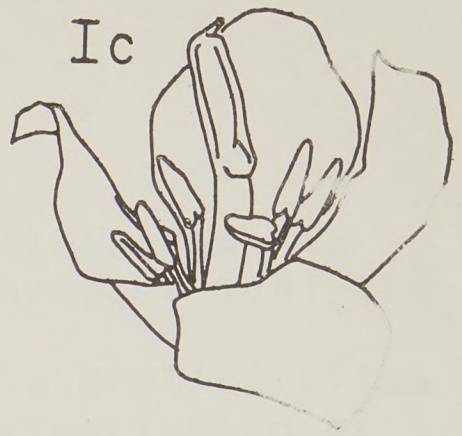
B Prolifération des pièces florales : p.



Ia



Ib



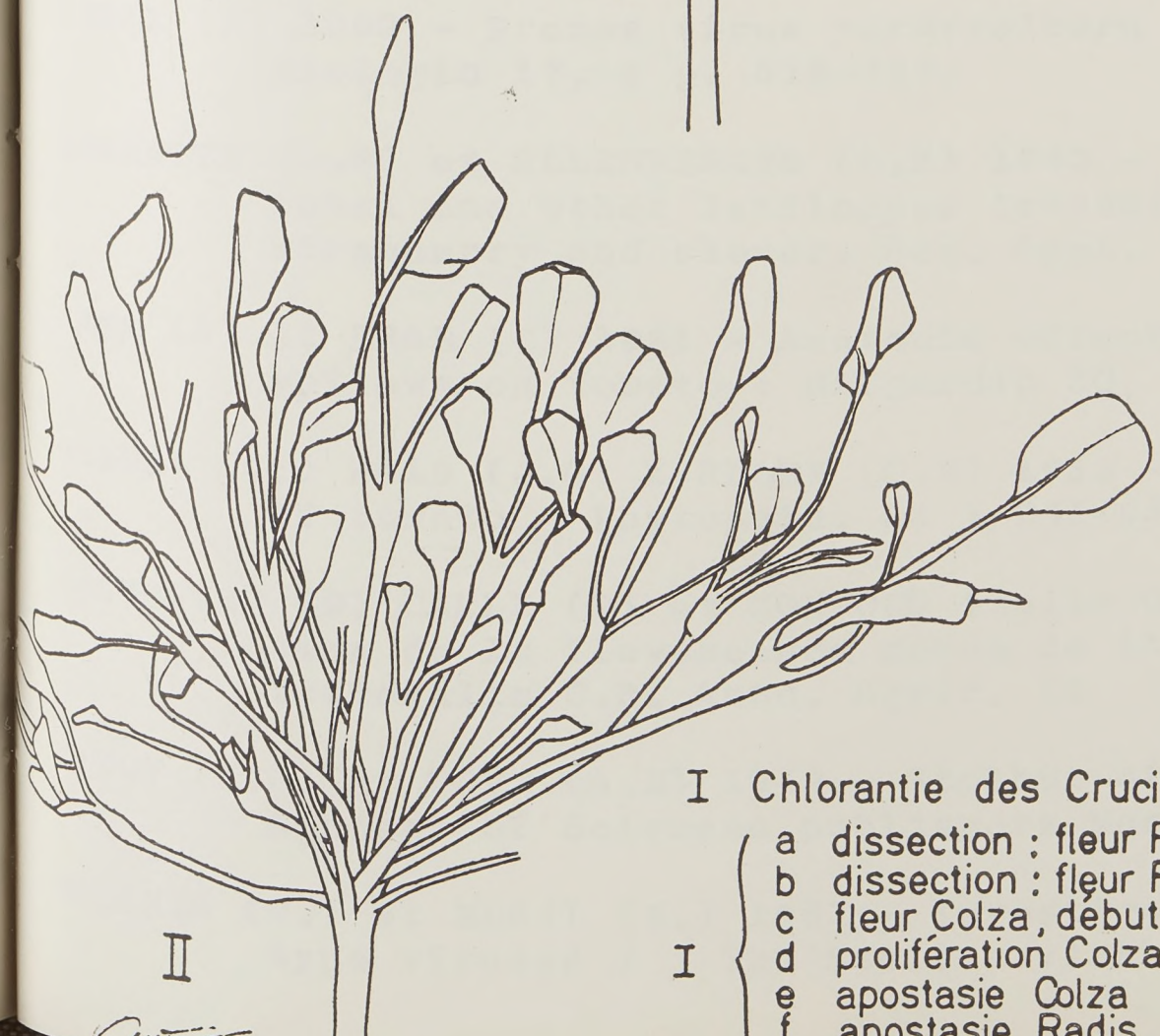
Ic

Id

Ie

If

Ig



II

IIIa

IIIb

I Chlorantie des Crucifères

I
- a dissection : fleur Radis saine
- b dissection : fleur Radis infectée
- c fleur Colza, début dattaque
- d prolifération Colza
- e apostasie Colza
- f apostasie Radis

II Phyllodie du Trèfle blanc

III Prolifération du Pommier
- a formation de stipules

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BLATTNY (C) 1954 - The use of Scallet pimpernale in a field test to the detection of Stolbur infected potatoes. Phytopat Z: 381-414

BLATTNY (C) VOJTECH (S) et ERBENOVA (M) 1963 - The apple prolifération of various sorts and the possible strain differenciation of the virus - Phytopath. Medit t.2, 3 p. 119-123.

BOS (L) 1963 - Symptoms of virus diseases in plants with indexes of names in englisch, dutch, german, french and Italian - Instituut voor plantenziektenkundig onderzoek Wageningen Nederland p. 76-82.

CHIYKOWSKI (L.N) 1961 - Transmission of clover phyllody by Aphrodes bicinctus (Schrank) in North America - Nature 192, 4802,p.581.

COUSIN (M.T) 1963 - Premières observations relatives à l'apparition dans la région Parisienne de maladies à virus de type jaunisse sur Tomate - Etudes de Virologie appliquée n° Mars 1963 p. 55-68.

EMBERGER (L) - Les végétaux vasculaires - Traité de Botanique systématique par CHADEFAUD(M) & EMBERGER (L).

MORVAN (G.) 1963 - Aspects morphologiques de la chlorantie du Colza Etudes de virologie appliquée n° 4 - Mars 1963 p. 51-52.

MUSIL (M.) 1961 - Transmission of clover Phyllody virus by means of the leafhopper : Euscelis Plebejus. Fallen. Biol. Plant. Acad. Sci. Bohemosl 3, 1 pp. 29-33.

MUSIL (M) 1962 - Prenos virus parartolburu kriskem Euscelis Plebejus Biologia 17, 5 p. 332-339.

POSNETTE (A.F) et ELLENBERGER (G.E) 1963 - Further studies of green petal and other leaflopper transmitted viruses infecting strawberry and clover. Ann. Appl. biol. 51, n° 1, 69-83.

RASA (A) et ESAU (C) 1961 - Anatomic effects of curly top and aster yellows on tomato : Hilgardia 30, 17 pp. 469-515.

SAMUEL (G.) BALD (J.G) EARDLEY (C.M) 1933 - Big Bud a virus disease of tomato - Phytopath. 23 : 641-653.

SCHVESTER (D) CARLE (P) et MOUTOUS (Melle G) 1963 - Sur la transmission de la flavescence dorée de la Vigne par Scaphoïdeus littoralis C.R. Acad. Agric. 16 23 Janvier 1963.

SUHOV (K.S) et VOVK (A.M) 1949 - Stolbur of Solaneous plants - USRR Academy of Sciences publishers Moscow - Leningrad.

VALENTA (V.) et MUSIL (M.) 1961 - Investigation on European yellows type viruses : I The Stolbur virus - Phytopath Z : 42,1.1-38.

INOCULATION MECANIQUE DU VIRUS I DU CONCOMBRE

-:-:-:-:-:-:-:-

J.MARROU C.FAUVEL*

Station de Pathologie Végétale Montfavet (Vse)

-:-:-:-:-:-:-:-

La présence d'un inhibiteur dans les extraits de Cucurbitacées rend délicat la transmission mécanique du virus 1 du concombre.

Les difficultés rencontrées pour inoculer ce virus au melon à partir de melons virosés ont fait préférer la transmission par puceron à l'inoculation mécanique dans les essais entrepris jusqu'ici à la station de Pathologie Végétale de Montfavet (MESSIAEN 1963). Cette méthode donne de très bons résultats mais demande des manipulations longues et délicates. Pour permettre l'infection rapide de nombreuses plantes, nous avons essayé d'élever et de régulariser le taux de réussite de l'inoculations mécanique.

Monsieur FELDMAN** a obtenu à Versailles de bons résultats pour inoculer mécaniquement des extraits de poivrons virosés à des tabacs, en mélangeant à l'inoculum du charbon activé (0,1gr. par ml.d'extrait). Des résultats comparables ont été obtenus par le même auteur pour infecter Solanum demissum avec le virus Y de la pomme de terre (FELDMAN 1963).

STANLEY en 1935, BALD (1937), KALMUS ET KASSANIS (1945) avaient déjà montré l'intêret du charbon pour faciliter la transmission mécanique des virus.

Plus récemment, CORBETT a réussi grâce à ce produit l'inoculation de la panachure infectieuse des Citrus, cette technique est utilisée couramment dans le laboratoire des agrumes de l'IFAC à Versailles.

---

* Nous tenons à remercier MMrs.MAISON et MIGLIORI qui ont bien voulu nous procurer des souches de virus I du concombre et nous aider dans la réalisation de ces essais.

** Professeur à la Facultad de Ciencias Agrarias. Cuyo Mendoza Argentine, en stage en 1963 dans le laboratoire de virologie (Mlle AUGIER de MONTGREMIER).

.ESSAIS PRELIMINAIRES.

Pour vérifier l'intêret du charbon dans la transmission du virus 1 du concombre, différentes plantes ont été inoculées avec des extraits de melon Charentais présentant des symptômes caractéristiques de mosaïque due au virus 1 du concombre.

- a) Préparation de l'inoculum. Un volume de feuilles de melon contaminé a été broyé dans un volume d'une solution de diethyldithiocarbamate de sodium M/I3. Le broyat a été homogénéisé dans trois volumes de tampon diphosphate pH 7 0,0I M, puis filtré sur étamine. 100 mg. de charbon végétal pur pour analyse (Prolabo) ont été ajoutés pour chaque ml. de filtrat. Le mélange a été agité 10 minutes à 4°C.

- b) Essais de différents hôtes.

Melon (Cucumis melo cv.Cantaloup Charentais) De jeunes melons au stade une vraie feuille ont été inoculés en présence de carborendum (220 fils). En 8 jours toutes les plantes ont extériorisé des symptômes graves de mosaïque.

Phytolacca decandra. Pour voir si le charbon intervenait en empêchant l'action d'inhibiteur d'infection, nous avons utilisé comme source de virus une plante de Phytolacca decandra dont les extraits sont réputés comme inhibiteurs. Dans cet essai la dilution était au demi et la molarité du tampon 0,5 M. Une partie de l'inoculum a été additionnée de charbon, l'autre a été utilisée directement. Neuf melons sur dix ont été infectés avec l'extrait charbon, une seule plante a été contaminée dans l'essai témoin.

Autres hôtes. Pour juger l'intêret du charbon nous avons préparé des extraits des plantes suivantes, contaminées de façon systémique par le virus 1 du concombre : melon, cote de blette (Beta vulgaris var. Cicla), tomate, Nicotiana glutinosa. Dans cet essai l'inoculum a été préparé avec un tampon phosphate pH 7 0,1M dans lequel avait été ajouté du diethyldithiocarbamate de sodium (M/I3). La dilution par rapport au poids frais était de I/5.

Vigna Sinensis. Pour poursuivre de façon quantitative l'étude des améliorations à apporter aux méthodes d'extraction et d'inoculation mécanique du virus 1 du concombre, nous avons choisi Vigna Sinensis. Cette légumineuse réagit à ce virus par la production de lésions locales sur les feuilles cotylédonaires (CROWLEY, I954).

Nous avons utilisé la variété "Black", les plantes étaient inoculées 10 à 15 jours après le semis. Pour juger l'intêret du charbon, nous avons préparé des extraits des plantes suivantes : melon, tomate, blette N.Glutinosa, infectées de façon systémique par le virus 1 du concombre. Dans cet essai les extraits ont été préparés avec un tampon pH 7 0,IM (DETC M/I3). La dilution par rapport au poids frais était de I/5. Six feuilles cotylédonaires de Vigna Sinensis ont été inoculées en présence de carborundum.

TABLEAU I

Effet du charbon sur l'infectivité de différentes préparations de virus 1 du concombre inoculée au Vigna Sinensis.

Source du virus.	Nombre moyen de lésions par feuille		Rapport Charbon / Témoin
	Témoin sans charbon	Avec 100mg.de charbon par ml.	
Melon	0	** 4II	∞
Blette	83,6	** 352,6	4,2
Tomate	33,6	** 259,8	7,7
Tabac	27,8	* 209	7,6
ppds ** I% =	I97		
5% =	I47		

Dans le cas du melon, l'effet du charbon est particulièrement net. Comme dans les essais précédents on peut supposer qu'un inhibiteur d'infection, présent dans le melon a été éliminé grâce au charbon. Dans le cas des autres sources de virus, la présence du charbon a multiplié le nombre de lésions locales par 4 ou par 7 bien que ces plantes ne soient pas considérées comme riches en substances inhibitrices.

Ces résultats et ceux que nous avons obtenus avec des virus et des plantes hôtes tout à fait différents ; virus latent de l'artichaut, virus de la Mosaïque de la laitue, virus de la Mosaïque du tabac, virus de la criblure du melon sur chenopode et sur tabac nous ont conduit à étudier le rôle du charbon au moment de l'inoculation des plantes par un virus. Cette note ne rendra compte que des résultats qui ont permis d'établir les meilleures conditions de travail pour doser sur Vigna Sinensis le virus 1 du concombre.

1- Choix du charbon. Différents charbons disponibles au laboratoire ont été comparés dans les mêmes conditions : tampon phosphate 0,01 M, pH 7 dilution I/10 par rapport au poids frais de feuilles de melon présentant des symptômes nets de mosaïque, 100 mg.de charbon par ml. d'inoculum.

En prenant le charbon végétal Prolabo comme référence (100) on peut noter l'activité des différents charbons de la façon suivante :

TABLEAU II

	pH d'une suspension de charbon dans l'eau	Activité des charbons
Charbon végétal Prolabo	7,2	100
Charbon Merck NF 62,300	7,2	77
Charbon activé Touzart & Matignon	9,3	138,8
Activit XL 50	10	158,6

Il existe des différences notables d'activité entre les différents charbons comparés. L'Activit XL 50 est 1,6 fois plus actif que le charbon végétal Prolabo. Ce charbon a été utilisé à l'exclusion de tout autre dans les essais suivants.

2- Molarité et pH du tampon. Des essais préliminaires ont attiré notre attention sur l'importance des tampons utilisés pour la préparation de l'inoculum.

- a) pH : Les meilleurs résultats sont obtenus en milieu basique.

Dans un essai avec des tampons 0,01M et 100 mg.de charbon par ml., les résultats suivants ont été constatés :

TABLEAU III

	6,4	7,1	7,7
Nombre moyen de lésions par feuille.	99,6	128,5	258,1*
ppds. I% =	155,9		

Dans un autre essai, avec des tampons 0,02M :, nous avons trouvé que le nombre de lésions augmente avec le pH jusqu'à un optimum pour pH 8,3. Des essais en cours indiquent qu'il faut dépasser pH 9 pour obtenir un effet dépressif net, avec un tampon phosphate 0,02 M.

Ces résultats sont corroborés par ceux obtenus dans des essais d'inoculation mécanique du virus 1 du concombre à des

melons et des poivrons. Sur melon charentais en floraison la vitesse d'apparition des symptômes, les taux de réussite croissent avec l'augmentation du pH.

TABLEAU IV

	pH	6,5	7,1	7,7	8,3
Taux de réussite de l'inoculation mécanique :	8 jours après	20	55,5	66,6	88,8
	15 jours après	66,6	55,5	66,6	88,8

Sur une variété de poivron (Capsicum annum cv."Sucette' variété locale qui présente au stade adulte une hypersensibilité au virus 1 du concombre), inoculée à pH 8,3 a donné deux fois plus de lésions primaires par feuille que les lots infectés à pH 7,5, huit fois plus qu'à pH 6,5.

Les symptômes sont apparus trois jours plus tôt sur les plantes inoculées en milieu basique.

Les différences de pH des suspensions de charbons comparés dans nos essais préliminaires (tableau 1) expliquent sans doute les différences d'activité constatées. Des essais sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

- b) Molarité : La molarité des tampons a également une grande importance. Nous avons constaté une perte totale de pouvoir infectieux pour des molarités supérieures ou égales à 0,5M. (tampon phosphate monopotassique disodique).

Plusieurs extraits de melon virosé dans des tampons pH 8,3 et de molarité croissante ont été préparés et comparés sur feuilles cotylédonaires de Vigna sinensis.

TABLEAU V

	0,012	0,025	0,05	0,1
pH avec 100mg charbon/ml.	9,2	9,2	9,2	9,2
Nb.moyen de lésions par feuille.	302,8	613,6**	426,6	203,8
ppds : 1% =	217,9			
5% =	158,1			

Les tampons 0,025 M donnent les meilleurs résultats. Au-delà doubler la concentration en sel fait perdre plus de 30% du pouvoir infectieux; la quintupler en fait perdre 67%.

Le pouvoir tampon est cependant insuffisant pour maintenir l'extrait de feuille au pH choisi. Malgré la forte dilution (I/I5) avec un tampon 0,025 M, pH 8,3 le suc de melon abaisse le pH à 7,5. Le charbon au contraire place l'inoculum en milieu nettement basique pH 9,3.

Les phosphates semblent avoir une influence primordiale les tampons Tris et Borax de même molarité et de même pH n'ont pas donné de bons résultats.

3- Quantité de charbon. Les essais de tampon ont été réalisés avec 100 mg.d'Activit XL.50 par ml. Des essais préliminaires avec du charbon végétal nous avaient indiqué que l'effet du charbon sur le pouvoir infectieux augmentait avec la dose entre 0 et I50 mg, au-delà, le nombre de lésions locales était au contraire fortement diminué. Nous avons cherché ènsuite à préciser la dose d'Activit optima à pH 8,3, dans un tampon phosphate 0,02 M.

TABLEAU VI

	0 mg	25 mg	50 mg	75 mg	100 mg	I25 mg
Nb. moyen de lésions par feuille	11	99	87	I87	I04	72
ppds 1% =	82					
5% =	60					

La dose de 75 mg. de charbon Actívit XL.50 donne les meilleurs résultats. Elle a été adoptée dans nos essais ultérieurs. L'effet dépressif de doses plus élevées de charbon a été vérifié dans un autre essai, réalisé dans les mêmes conditions.

TABLEAU VII

	0	I00	I25	I50	I75
Nombre moyen de lésions par feuille.	49,8	I0I,2	4,8	0,6	0,4
ppds : 1% =	54				
5% =	40				

4- Effet des inhibiteurs des réactions d'oxydation et de substances réductrices. Dans le cas particulier du melon, nous avons cherché à vérifier l'intêret des inhibiteurs de la polyphenol oxydase et des substances réductrices dans la préparation des extraits infectieux. Dans cet essai, les feuilles de melons virosés ont été broyées dans 1 volume de solution aqueuse du produit étudié puis dilué dans I4 volumes de tampon phosphate 0,IM pH 7,7.

TABLEAU VIII

	DETC M/I3	KCN M/I3	KNC M/I3 + BISUL.5‰	BISULFITE 5‰	H2O
Nb.moyen de lésions par feuille	302,2	280	298	486	665**
ppds 1% =	I84,5				
5%=	25I,6				

La présence de réducteur ou d'inhibiteurs de réaction d'oxydation diminue de façon notable le nombre de lésions locales. Ces résultats sont en accord avec les travaux de MENKE & WALKER (I963) qui ont montré que l'activité de la polyphenol oxydase était très réduite chez les Cucurbitacées.

Si le virus 1 du concombre est extrait d'autres plantes (tomate, tabac...) il est au contraire indispensable d'inhiber les réactions d'oxydo réduction.

ROLE DU CHARBON.

Le charbon est absorbant. Les résultats obtenus avec les extraits de Phytolacca decandra et de melon montrent que le charbon empêche l'action des inhibiteurs d'infection. Ces substances sont peut être absorbées sur les particules pulvérulentes de charbon, ou bien le virus échappe à l'effet dépressif des inhibiteurs en étant lui-même fixé par le charbon. Cette seconde hypothèse est plus proche de la réalité. Lorsque le charbon est ajouté au moment du broyage, puis filtré sur étamine, il n'augmente pas le pouvoir infectieux. Les extraits de melon virosé et de charbon filtré sous vide sur papier Watman n°I perdent une grande partie ou la totalité de leur pouvoir infectieux.

Dans un essai, un extrait préparé avec un tampon phosphate 0,02M, pH 8,3 dilution I/I5 a été divisé en deux fractions. L'une a été utilisée sans charbon. L'autre a reçu 75 mg. de charbon Activit XL.50 par ml. Une partie a été inoculée, l'autre a été filtrée, puis inoculée.

Dans tous les cas, le carborundum était utilisé comme abrasif.

TABLEAU IX

	Témoin	75 mg.de charbon	Filtrat d'un extrait avec charbon
Nb.moyen de lésions par feuille.	22,3	303,3**	I8,6
ppds : I%=	66,69		

D'autres essais avec des tampons 0,0IM pH 7 ont confirmé ces résultats. Le charbon fixe une fraction importante

des particules infectieuses sans leur enlever leurs propriétés biologiques.

Le charbon est un abrasif. Pour KALMUS & KASSANIS, le charbon agirait sur l'hôte par ses propriétés abrasives. Les blessures qu'il provoque sur feuilles, sont très fines et facilitent l'introduction du virus. L'essai rapporté dans le tableau suivant confirme ces travaux.

TABLEAU X

	75mg.de charbon par ml.	75mg.de charbon+Carborundum	Carborundum seul
Nb de lésions par feuille	I20	II7,8	32,I6*
ppds : 5% =	72,5		

L'Activit XL.50 est un très bon abrasif. Le carborundum donne près de quatre fois moins de lésions. La présence des deux substances n'augmente pas le taux d'infection. Il est donc inutile d'utiliser le carborundum pour doser le virus 1 du concombre sur Vigna Sinensis.

Avec d'autres hôtes, il convient de vérifier l'efficacité du charbon en tant qu'abrasif. Sur Nicotiana glutinosa, le charbon ne semble pas avoir un effet suffisant., pour obtenir de nombreuses lésions avec le virus de la Mosaïque du tabac. Le mélange carborundum et charbon est au contraire favorable.

CONCLUSION.

Le rôle du charbon est complexe. Aucune des hypothèses présentées ne suffit à expliquer le mode d'action de ce produit. Le charbon agit en empêchant la dénaturation du virus par les inhibiteurs. Le charbon agit sur l'hôte par son effet abrasif et d'après BALD (I937) en jouant le rôle d'un agent tensioactif facilitant les contacts entre les particules infectieuses et les cellules épidermiques de l'hôte.

L'influence du pH et de la molarité du tampon sur l'efficacité du charbon laissent supposer que le charbon a plus qu'une action mécanique sur les cellules épidermiques de la feuille. L'inoculation d'acide nucléique infectieux avec et sans charbon nous permettra peut-être de préciser le rôle du charbon.

Dès maintenant, l'addiction de charbon nous a permis de réussir de nombreuses infections dans des conditions jusqu'ici hasardeuses. La méthode peut être adaptée à d'autres virus et à d'autres hôtes. Le pH du tampon d'extraction doit être étudié pour chaque cas particulier. La formule pH 7 0,02M, 100mg par ml.de charbon végétal semble être utilisable comme formule de départ avec toutes les combinaisons de virus et d'hôtes pour extraire et identifier rapidement de faibles quantités de virus.

BIBLIOGRAPHIE

BALD JG. I937. The effect of carbon on the production of lesions by viruses of Tobacco mosaic group. ANN.APPL.BIOL.24.p.77

CORBETT M.K.& GRANT I.J. Mechanical transmission of the infectious variegation virus of citrus. NATURE.I88.p.5I9.520

CROWLEY N.C. I954. Some variablesaffecting the use of cow pea as an essay host for CMV. AUSTRAL.J.BIOL.SCI.7.2.p.I4I.I50.

FELDMAN JM. I963. Amélioration de la technique d'inoculation mécanique du virus Y pour la détection des souches. LA POMME DE TERRE FRANCAISE.N°289.p.4.7

KALMUS H. & KASSANIS B. I945. ANN.APPL.BIOL.32.p.230

MENKE G.H. & WALKER J.C. I963. Metabolism of resistant and susceptible cucumber varieties infected with CV1. PHYTOPATH.53.II.p.I349.

CM.MESSIAEN P.MAISON & A.MIGLIORI. I963. Le virus 1 du concombre dans le Sud-Est de la France. PHYTOPATH.MEDIT.VOL.II.n°4.p.25I.260.

STANLEY W.M. I935. Studies of the virus of tobacco mosaic IV. PHYTOPATH.25.p.899.920.

* *
*

LIBERATION D'ACIDE RIBONUCLEIQUE VIRAL INFECTIEUX au cours du broyage de feuilles de Haricot infectées par le Virus de la " Southern Bean Mosaïc "

B. DIGAT
Station Centrale de
Pathologie Végétale

INTRODUCTION

A la suite des travaux de BROWNHILL (1959), de SINGER, FRAENKEL-CONRAT et TSUGITA (1961), on sait que la Bentonite protège et stabilise l'Acide Ribonucléique viral (RNA) durant son extraction.

On explique cette action protectrice par la propriété que possède la Bentonite d'adsorber fortement la Ribonucléase (RNase).

Dans l'étude qui suit, cette propriété a été utilisée pour montrer qu'il y a bien une libération importante de RNA infectieux, dans des conditions expérimentales définies, au cours du broyage de feuilles de Phaseolus vulgaris var. "Top Crop" infectées par le Virus de la "Southern Bean Mosaic" (SBMV).

On pouvait supposer en effet que, lors du broyage, la RNase foliaire détruisait rapidement le RNA viral libre de telle sorte qu'il n'était ensuite plus possible de mettre en évidence sa présence dans l'extrait obtenu.

MATERIEL ET METHODES

Le Tamp n utilisé pour l'extraction est celui de SOERENSEN à pH 7,3 et à 0,1 M (Phosphate Monopotassique - Phosphate Disodique).

On prépare la suspension de Bentonite WYOMING en m@ttant 100 mg de produit par ml de Tampon Phosphate. Après avoir agité cette suspension durant 60 minutes, on la centrifuge à 4000 t/m durant 15 minutes. On ne conserve que le surnageant.

L'extraction est réalisé par broyage de 1 gramme de feuille de Phaseolus vulgaris var. "Top Crop" infectées depuis 3 semaines dans 6 ml de Bentonite tamponnée (suspension B) ou dans 6 ml de Tampon Phosphate pour la suspension-témoin (suspension T).

On centrifuge les extraits obtenus 15 minutes à 6000t/m. Les surnageants sont inoculés à des feuilles cotylédonnaires de Phaseolus vulgaris var. "Pinto" selon la méthode habituelle. Une feuille est inoculée avec la suspension B, la feuille opposée par la suspension témoin T.

Le milieu gélosé utilisé pour mettre en évidence la présence du RNA a la composition suivante :

Gélose (Bacto-Agar-Difco)	1,2 g
Orangé d'Acridine	100 mg
Tampon Tris - Cl H(0,4M,pH92)	1000 ml

Le milieu est mis en Boîte de Petri. La suspension à étudier est disposée dans de petites alvéoles creusées dans le milieu. En éclairant la plaque en Ultra-violet on doit observer, au bout de quelques heures, la formation d'un complexe fluorescent formé par le RNA sur lequel s'est fixé l'orangé d'Acridine et qui diffuse dans le milieu à partir de l'alvéole.

Pour doser la RNase, on utilise le milieu suivant :

Gélose (Bacto-Agar-Difco)	1,2 g
Orangé d'Acridine	100 mg
RNA de levure	200 mg
Tampon Phosphate (0,1M pH 5,1)	1000 ml

La suite des opérations est la même que précédemment. La zone lysée par la RNase est nettement visible puisqu'elle perd sa fluorescence.

RESULTATS

1 - Elimination de la RNase durant le broyage

On met à diffuser les suspensions T et B dans les milieux gélosés. Les suspensions Témoin T produisent une zone lysée d'un diamètre de 20 mm environ.

Par contre, il n'est plus possible de mettre en évidence la moindre trace de RNase dans les suspensions B traitées à la Bentonite.

2 - Présence de RNA

Les suspensions Témoins T ne montrent aucune fluorescence perceptible dans le milieu gélosé en présence d'Orangé d'Acridine.

Au contraire, les suspensions B montrent une très forte fluorescence. Cette très forte fluorescence est attribuée à la présence d'une quantité importante de RNA.

.../...

3 - Présence de RNA libre et infectieux

On ajoute la Bentonite à différents instants après le broyage. On obtient les résultats suivants +

SUSPENSIONS	MOMENT OU LA BENTONITE EST AJOUTEE		
	durant le broyage	5ème minute après broyage	20è minute apr. broyage
B	27	25	8
T	16	10	7

+ Les nombres de lésions locales ci-dessus indiqués sont des nombres moyens obtenus sur 6 répétitions à raison de 36 plantes par répétition.

DISCUSSION

Le plus grand pouvoir infectieux de la suspension traitée par la Bentonite (B) par rapport à celui de la suspension témoin (T) est attribué , notamment, à la présence d'une plus grande quantité de RNA viral infectieux.

Il ne fait aucun doute que cèt RNA viral infectieux est libéré dans le milieu d'extraction. En effet, si on attend 20 minutes après le broyage pour ajouter la Bentonite inhibitrice de la RNase, on observe presque plus de différence de pouvoir infectieux entre la suspension B et la suspension T.

Cependant le mécanisme exact de cette libération n'est pas encore précisé. Car si la Bentonite est ajoutée 5 minutes seulement après le broyage, le pouvoir infectieux de la suspension B ne baisse que très légèrement.

Il faut donc admettre qu'il existe encore 5 minutes après le broyage assez de RNA viral intact pour maintenir ce pouvoir infectieux.

La question de savoir si cet RNA existe, au moment du broyage, à l'état "libre" ou "protégé" dans la cellule ou bien s'il est libéré à partir de particules virales "instables" ou "dégradées reste posée.

BIBLIOGRAPHIE

BRACHET J. - The use of basic dyes and Ribonuclease for the cytochemical detection of RNA.
Quart. J. micr. Sci. 94, 1-10.

BROWNAILL T.J., JONES A.S. et STACEY M. - Biochem. J.73(1959)434

FRAENKEL-CONRAT, SINGER et TSUGITA - Purification of viral RNA by means of Bentonite. Effects of Bentonite on infectivy and stability of TMV-RNA. - Virology 14 (1961) 54-65

KASSANIS et WELKIE - The Nature and Behavior of unstable variants of TNV. - Virology 2I (1963) 540-550.

MAJOR et DIWAN - Studies on the Acridine Orange staining of two purified RNA virus : Polio et TMV.
Virology 14 (1961) 74-82.

SIESKIND O. et WEY R. - Etude des complexes d'adsorption formés entre la Montmorillonite H et certains acides aminés Isotherme d'adsorption à pH 2 et à 20° C.
C.R. Acad.Sci. 250 (2) 1960 2228 -2230.

SIESKIND O. - Sur l'adsorption d'acides aminés par la Montmorillonite H. Influence de la position relative des deux fonctions - NH 2 et COOH.
C.R. Acad. Sci. 248 (1), 1960 : 1652.

L'UTILISATION DES HOTES DIFFERENTIELS DANS L'ISOLEMENT ET L'IDENTIFICATION DES VIRUS DES LEGUMINEUSES

J.C. DEVERGNE

Depuis 1957, la Station Centrale de Pathologie Végétale à Versailles, s'est intéressée à la reconnaissance des viroses du haricot, du pois, de la fève et des trèfles. L'observation des symptômes sur les plantes infectées dans les conditions naturelles, et sur les hôtes différentiels inoculés expérimentalement, a permis l'identification de virus dont certains avaient déjà fait l'objet d'études à l'étranger, montrant ainsi la présence en France de nombreux virus par ailleurs largement répandus, tandis que d'autres s'avéraient être des souches particulières.

La liste des virus déjà décrits sur les légumineuses est longue. Une nomenclature récemment proposée y fait figurer 42 virus propres aux légumineuses, auxquels s'ajoutent également 16 autres virus, plus fréquents sur d'autres plantes mais pouvant occasionnellement se rencontrer sur certaines papillionacées. Par suite, le travail d'identification d'un nouvel isolement est-il quelquefois assez délicat, lorsqu'il faut comparer celui-ci avec de nombreuses autres descriptions souvent voisines.

L'"International Working group for legume viruses" a pour objet, d'informer les virologistes s'intéressant aux problèmes des légumineuses, des activités et des résultats obtenus en ce domaine, de favoriser les échanges entre chercheurs et, notamment, de permettre une comparaison plus directe des divers isolements étudiés dans chaque pays. Cette collaboration suppose naturellement, l'utilisation de méthodes communes d'identification, que le Dr BOS (1) à Wageningen, a été un des premiers à préconiser.

L'infection virale est, au départ, reconnue par les modifications externes qu'elle provoque sur la plante malade, et son caractère infectieux démontré par la reproduction de ces mêmes manifestations sur la plante expérimentalement contaminée. D'autre part, la transmission du virus à d'autres espèces ou variétés que celle initialement infectée, permet d'établir pour ce virus, un spectre d'hôtes qui lui est caractéristique. La symptomatologie est donc le premier moyen d'identification.

Cette approche indirecte de l'identité virale, par l'intermédiaire de la réaction de ses hôtes, reste cependant assez incertaine. On conçoit aisément, en effet, que les perturbations du métabolisme végétal, provoquées par des virus cependant très différents peuvent se traduire extérieurement par des altérations voisines, ce qui rend leur identification difficile. Sur le pois, par exemple, à côté des mosaïques et des chloroses, apparaissent fréquemment des taches nécrotiques dont certaines qui s'allongent en stries verticales brun noir sur les tiges, constituent ce que l'on appelle un

---

(1) - BOS (L) HAGEDORN (DJ), QUANTZ (L) 1960. T.Pl.ZIEKTEN 66 (328-343)

.../...

"streak", (ou bigarrure). Ces nécroses ont pour conséquence directe le flétrissement plus ou moins tardif du végétal. Un virus du "streak" du pois, a donc été décrit (2), puis des symptômes identiques, ont été ensuite reconnus sur des pois infectés par des virus très différents (3) ; ce type d'altération peut être le reflet d'une infection par les virus de la maladie bronzée de la tomate ("spotted wilt") de la mosaïque du concombre, du ringspot du tabac, de la mosaïque du trèfle blanc, et par plusieurs souches du virus de la mosaïque de la luzerne, sans compter les véritables virus du streak du pois, dont on a dénombré aujourd'hui au moins six isolements distincts.(4)

Pour préciser la nature du virus en cause, on est donc ainsi rapidement amené à multiplier le nombre des hôtes du spectre en évitant les réactions de convergence qui deviennent de plus en plus fréquentes au fur et à mesure qu'augmente le nombre des virus ou de leurs souches, nouvellement décrits.

Cette recherche d'hôtes différentiels s'est naturellement orientée vers les espèces hypersensibles qui ont l'intérêt de réagir rapidement par des lésions, localisées, sur le végétal, aux parties inoculées. De plus ces hôtes permettent parfois d'évaluer quantitativement la richesse de l'inoculum en éléments infectieux.

Certains haricots (haricot cultivé, Phaseolus aureus) et le Vigna sinensis (particulièrement la variété Black) se comportent parfois en hôtes à lésions locales. En dehors des légumineuses, la famille des chenopodiacées a été récemment beaucoup utilisée, depuis que les travaux de HOLLINGS (5) ont précisé les réponses locales chez le Chenopodium amaranticolor et le Ch. Quinoa. Cette réaction d'hypersensibilité doit cependant davantage trouver son origine dans la nature de l'hôte que dans celle du virus : le Vigna sinensis donne des lésions avec plusieurs virus du haricot et avec le virus de la mosaïque du concombre ; les chenopodes avec un nombre encore plus grand de virus par ailleurs très différents.

On a souvent reproché aux symptômes, et à juste titre semble t-il, de n'être pas toujours fidèles, ou tout au moins, étant donné les nombreux facteurs qui peuvent intervenir dans les relations hôtes-virus, d'être sujets à des variations importantes, en fonction des conditions de l'expérimentation. Il serait fastidieux d'énumérer ici tous les facteurs qui peuvent modifier, d'une part les chances d'infection, d'autre part l'extériorisation des symptômes. On peut rappeler cependant que ces derniers sont fonction :

1) de la nature de l'inoculum (plante à partir de laquelle le virus a été extrait, degré de purification et de concentration de l'extrait infectieux, virus entier ou acide nucléique isolé).
2) de l'état de la réceptivité de la plante hôte au moment de l'inoculation (âge de la plante, conditions de milieu dans lesquelles elle s'est développée avant l'inoculation).
3) du mode d'inoculation (greffage, inoculation mécanique en présence d'abrasifs ou de sels, transmission par vecteurs).

---

(2) - ZAUMEYER (WJ) 1937. Phytopathology 27 (144)
(3) - KIM (WS) 1958. Ph. D. Thesis. Univ. Wisconsin
(4) - KIM (WS), HAGEDORN (DJ).1959 Phytopathology 49 (656-663)
(5) - HOLLINGS (M) 1959. Ann. Appl. Biol. 47-1 (98-108)

.../...

4) des conditions de milieu dans lesquelles se poursuit l'infection (notamment, température, humidité, photopériodisme), qui peuvent retarder, modifier ou inhiber l'apparition des symptômes typiques.

Dans le cas du virus de la mosaïque de la luzerne, par exemple, la concentration de l'inoculum utilisé est très variable selon que le prélèvement sur la plante malade a lieu plus ou moins longtemps après l'infection de celle-ci (avec une concentration maximum à 15 jours de la contamination) et les chances d'infection de la plante test varient dans le même sens. ADLERZ (6) a étudié comparativement la valeur de différentes plantes hôtes comme sources d'inoculum du virus de la mosaïque jaune de haricot, transmis par puceron, et les pourcentages de réussites sont variables suivant que l'on utilise la fève, le trèfle hybride, le pois ou le haricot.

L'âge de la plante-test est très important ; les réactions locales du haricot se lisent toujours sur les feuilles cotylédonaires de jeunes plantules issues de semis ; de même les symptômes locaux sur chenopodes peuvent varier en fonction du développement des feuilles qui sont inoculées et l'on utilise habituellement les feuilles des étages moyens.

Quant au rôle joué par la température, le meilleur exemple est certainement celui de la réaction nécrotique du type "black-root" qui apparait sur certaines variétés de haricots inoculées mécaniquement avec le virus de la mosaïque commune ; cette réaction est caractéristique des variétés dites "résistantes", issues plus ou moins directement de la variété "Corbett Refugee" (résistance dominante) mais ne se manifeste que lorsque la plante inoculée est placée à température élevée (32°C).

Enfin les variations saisonnières ne sont pas rares : ainsi, les symptômes nécrotiques sur les fèves inoculées sont beaucoup plus fréquentes en hiver et cette remarque est valable pour plusieurs virus différents.

.....

Indépendamment de ces fluctuations dans l'expression des symptômes, il est bien souvent illusoire d'espèrer identifier avec certitude un nouvel isolement, en utilisant uniquement la symptomatologie. Sauf pour des cas très particuliers et rares, le critère symptôme est insuffisant, de sorte qu'il est quelquefois difficile de comparer les isolements récents avec des descriptions plus anciennes qui, essentiellement basées sur la réaction de quelques hôtes, s'avèrent aujourd'hui incomplètes.

Certaines propriétés annexes liées au pouvoir infectieux sont fréquemment utilisées, comme la température à laquelle le virus perd son infectivité (inactivation thermique) ou la durée pendant laquelle cette infectivité se conserve dans les extraits végétaux in vitro (conservation in vitro).

Le mode de transmission du virus, par voie mécanique, par insectes ou par nématodes, constitue également un moyen d'identifi-

---

(6) - ADLERZ (W.C.) 1959. Jour. Econ. Ent. 52-2 (260-262)

.../...

cation, outre l'intérêt que présente l'étude de ces propriétés dans l'épidémiologie du virus et par suite dans les modalités de lutte pratique contre l'infection.

Les viroses des légumineuses offrent, à ce point de vue, un échantillonnage assez complet des différents types de transmissions puisque nous y trouvons des virus transmis par cicadelles (phyllodie du trèfle), par thrips ("spotted wilt" sur pois) par nématodes (brunissement précoce du pois) et surtout par aphides, avec dans ce dernier cas, des exmeples de transmission s'effectuant sur le mode persistant (mosaïque enation ou jaunisse apicale du pois).

Aux renseignements fournis par l'observation des symptômes s'ajoutent enfin les résultats d'études que les techniques modernes d'investigation ont aujourd'hui rendu possibles. Les nouvelles méthodes de purification et de concentration des extraits de végétaux virosés, permettent maintenant d'étudier les caractéristiques physico-chimiques du virus, indépendamment de ses propriétés infectieuses : le microscope électronique renseigne sur sa forme ; l'antisérum de titre élevé, précise ses propriétés antigéniques et les parentés sérologiques éventuelles avec d'autres virus végétaux ; dans quelques cas, une étude physico chimique de la nucléo-protéine permet enfin d'approcher sa constitution.

Ces caractères intrinsèques des virus forment la matière du diagnostic "étiologique", par opposition aux caractères infectieux qui constituent le diagnostic "clinique".

Beaucoup de virus de légumineuses ont déjà été observés au microscope : virus parasphériques du type mosaïque ou marbrure de la fève ; virus en bâtonnets courts comme celui de la mosaïque de la luzerne ou en bâtonnets flexueux comme ceux des mosaïques du pois et du haricot. Les propriétés sérologiques ont confirmé l'individualité de certains virus (mosaïque de la luzerne) ou, au contraire, rassemblé certains autres dans des groupes sérologiques", en liaison parfois étroite avec leur morphologie (7)Le "southern bean mosaïc virus", ou les virus parasphériques de la fève ont été l'objet d'études physico chimiques plus poussées.

Ces diverses propriétés aident aujourd'hui considérablement à l'identification. Elles doivent par ailleurs obligatoirement figurer sur la carte d'identité d'un virus nouveau.

La critique est sévère, qui montre à la fois la variabilité et l'insuffisance de la symptomatologie et l'on serait tenté, après un tel réquisitoire de minimiser, par conséquent, la valeur des renseignements qu'apporte ce critère. Néanmoins, en raison même de la facilité avec laquelle beaucoup de virus se transmettent mécaniquement et en remarquant à ce propos, que les méthodes actuelles permettent souvent de préserver le virus au cours de son extraction, dans le cas de virus labiles ou de plantes hôtes renfermant des substances inhibitrices, l'utilisation du spectre d'hôtes, reste encore la base de toute étude de virologie appliquée.

---

(7) - BRANDES (J), WETTER (C) 1959. Virology 8 (99-115)

.../...

Certains virus, comme celui de la mosaïque de la luzerne peuvent infecter 92 espèces végétales appartenant à 28 familles botaniques (8). L'énumération de tous les hôtes reconnus pour un tel virus, a certainement une indéniable valeur documentaire ; il parait cependant beaucoup plus profitable aujourd'hui de reconsidérer la gamme d'hôtes d'un virus, d'un point de vue plus pratique, en ayant soin, compte tenu des critiques énoncées plus haut, de la faire à la fois plus précise et plus différentielle.

Pour qu'une réaction caractéristique conserve toute sa valeur de symptôme de référence, il faut qu'elle soit reproductible.

On ne saurait trop insister par conséquent sur l'importance d'une description détaillée des manifestations observées, avec mention dans chaque cas, des conditions dans lesquelles l'expérimentation a été réalisée. Certains termes de symptomatologie sont actuellement universellement reconnus; des systèmes d'abréviations ont également été proposés, dont s'inspire celui qui sera utilisé plus loin.

Une bonne illustration de cette nécessité de préciser dans ses moindres détails la réaction d'un hôte caractéristique nous est encore fournie, par les chenopodes. Nous avons déjà noté, chez ces plantes, leur caractère d'hypersensibilité qui paraît s'appliquer à beaucoup de virus. Si l'on veut conserver la valeur différentielle de ces hôtes, on devra noter la date d'apparition des lésions locales après l'inoculation, leur taille, leur couleur, leur évolution au cours de l'infection qui pourra, le cas échéant devenir systémique.

Le choix de la plante-test est le résultat d'une étude comparative. Chez cette plante, la réponse à l'infection est différentielle dans la mesure où elle ne se manifeste pas de la même manière pour deux virus qui sont voisins. Parfois l'espèce (ou la variété) est sensible à l'un, alors qu'elle est résistante à l'autre.

Le cas particulier des différentes souches du virus de la mosaïque commune du haricot est très significatif à ce sujet : ce virus n'infecte pratiquement que le haricot cultivé, et le seul moyen de reconnaître la souche avec laquelle on travaille, est l'utilisation de variétés résistantes qui, s'étant par la suite montrées sensibles à certains isolements, servent, pour ceux-ci de seul critère de différenciation.

En général, les hôtes différentiels permettant de définir sans ambiguité l'identité d'un virus, n'existent malheureusement pas et nous avons discuté plus haut de cette carence, puisque, outre ses caractéristiques infectieuses, nous avons vu qu'il fallait faire appel, pour cela, à d'autres propriétés du virus. Mais, à défaut d'identifier le virus, l'hôte différentiel convenablement choisi, peut permettre de l'isoler et il semble bien que ce soit là, le principal intérêt pratique de la connaissance exacte de la gamme d'hôte. Pour cette raison, à côté de la vraie gamme

---

(8) - PRICE (W.C), 1940. Amer. J. Bot. 27 (550-541)

.../...

d'hôtes du virus, c'est à dire de la liste des plantes qu'il est susceptible d'infecter, et comme cette liste reste toujours limitée au nombre d'espèces qui ont été essayées, doivent figurer également les espèces voisines qui ont été montrées résistantes ou immunes. Après infection par inoculation avec un extrait inconnu, l'hôte résistant à un virus donné permet, non seulement de conclure à l'existence, dans cet extrait, d'un autre virus que celui-ci, mais de plus permet également de l'éliminer réellement.

La plante test n'est plus seulement utilisée comme méthode de diagnostic mais aussi comme méthode d'isolement. L'hôte différentiel joue le rôle de plante-filtre.

Il convient ici de prendre garde au fait que l'absence de symptôme ne signifie pas toujours absence d'infection. Quelquefois la période d'incubation dans la plante infectée est très longue (le trèfle blanc réagit un mois ou plus, après l'infection); mais surtout le virus peut y être latent. La plante qui se comporte alors en porteuse saine, puisqu'elle n'extériorise pas, héberge malgré cela, le virus, et n'est plus 'une plante filtre. Ainsi la luzerne montre rarement des symptômes lorsqu'elle est inoculée, bien qu'elle soit sensible à un grand nombre de virus. On peut alors démontrer par des rétroinoculations à des espèces sensibles, que le virus est présent dans la plante considérée; dans la négative seulement, l'espèce pourra être considérée comme immune.

La notion de plante-filtre nous apparaît très importante aujourd'hui et peut être plus spécialement pour les virus des légumineuses. Beaucoup de ces virus ont en effet des hôtes communs. La fève, par exemple, peut-être infectée par 14 virus différents, et, en fait, il est beaucoup plus rare qu'on pouvait le penser au départ, de trouver dans la nature une plante telle que la fève ou le Trèfle violet, n'hébergeant qu'un seul virus. C'est le problème des complexes de virus, dont les exemples sont nombreux; le virus de la mosaïque jaune du haricot est fréquemment associé, sur le trèfle blanc, au virus de la mosaïque de la luzerne; plusieurs souches ont même été simultanément décrites (9). De même les affections du type "streak" sur le pois sont très souvent le résultat de complexes (10).

Rappelons également, la distinction du complexe étudié par JOHNSON (11) sur le trèfle blanc, en "pea mottle" et "pea wilt", (appellations qui sont abandonnées) qui illustre parfaitement l'utilisation des plantes-filtres.

D'autres méthodes qui ne nous intéressent pas ici, peuvent être naturellement utilisées dans la séparation des virus, comme l'inactivation thermique, les vecteurs spécifiques ou les techniques physiques de purification (ultracentrifugation différentielle, électrophorèse).

Or, l'isolement d'une souche pure à partir d'un éventuel complexe, est le premier souci du virologiste et le point de départ de toute étude plus complète du virus. Nous pensons surtout aux méthodes sérologiques actuelles qui permettent l'obtention d'antisérum de titre élevé et à propos desquelles, on a été amené à faire de très intéressantes études comparatives de sérologie croisée. La sensibilité de ces méthodes rend désormais possible la reconnaissance, entre virus, de parentés quelquefois lointaines; elle exige en contre partie, des extraits antigéniques débarassés de toute contamination. Ceci est un véritable écueil lorsqu'il s'agit de comparer des virus ou des souches de virus à gammes d'hôtes pratiquement identiques (12).

---

(9) - HOUSTON (B.R), OSWALD (JW) 1953 Phytopathology 43 (271-276)
(10)- SCHROEDER (WT), PROVVIDENTI (R) MC EWEN (FL) 1959 Plant Dis.Rept.43 (1219-1226)
(11)- JOHNSON (F) 1942. Phytopathology 32 (103-116)
(12)- WETTER (C), QUANTZ (L), BRANDES (J) 1959. Phytopath. Z.35 (201-204)

De la même manière, toute étude intrinsèque du virus suppose au préalable son isolement.

On peut donc conclure que l'hôte différentiel sert peut être davantage à l'isolement d'un virus qu'à sa véritable identification; sa contribution dans ce dernier domaine est loin cependant d'être négligeable, mais d'autres critères sont nécessaires pour confirmer les premiers résultats obtenus. De toute manière, la symptomatologie est toujours le point de départ de l'étude d'un nouvel isolement.

.....

Nous nous sommes proposés de rassembler dans les pages qui suivent un certain nombre de renseignements concernant les réactions caractéristiques chez les hôtes des principaux virus des légumineuses (haricot, pois, fève, trèfle et luzerne). Pour chaque plante, la détermination des virus est impossible par la seule observation des symptômes apparus au champ; nous présentons cependant une première clef simplifiée qui ne saurait être qu'indicatrice.

Quelques hôtes différentiels sont ensuite rapportés pour chaque virus mentionnés auxquels s'ajoutent des espèces immunes utilisables pour les réactions comparatives.

Bien qu'incomplets, ces renseignements pourront, nous l'espèrons, être utiles en première approximation, à tous ceux auxquels se posent des problèmes de détermination de virus sur légumineuses.

.....

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

SYMPTOMES

Chl	:	chlorose
ChlSp	:	taches chlorotiques (="Chlorotic Spotting")
D	:	déformations
FB	:	Bigarrure sur fleurs (="Flower Breaking")
LL	:	lésions locales.
(Chl/ou N)LL	:	lésions locales chlorotiques/ou nécrotiques
M	:	mosaïque, marbrure (=Mosaïc, Mottle")
N	:	nécroses
RSp	:	taches en anneaux (="Ringspot")
Str	:	bigarrure sur tige (="Streak")
Stu	:	rabougrissement, nanisme (="Stunting")
TN	:	nécrose du sommet (="Top Necrosis")
VB	:	mosaïques des nervures (="Vein Banding")
VC	:	éclaircissement des nervures (=Vein Clearing")
VN	:	nécrose des nervures (="Vein Necrosis")
W	:	flétrissement (="Wilt")
Lat	:	virus latent

NB - Pour les symptômes faibles, les mêmes abréviations sont utilisées en caractères minuscules.

VIRUS DU HARICOT

TABLEAU I

Principaux types de symptômes OBSERVES EN FRANCE sur le haricot cultivé.
Clef de détermination des grands groupes de virus susceptibles de provoquer ces symptômes.(+)

1a) sur feuilles cotylédonaires de jeunes plantules

larges plages vert sombre irrégulières et enroulement marginal. (transmission par graine).....

1b) sur feuilles trifoliolées / éclaircissement général des nervures; mosaïque verte du type "vein banding"; feuilles enroulées en cuillère; mosaïque très déformante avec cloques vert foncé; filiformisme,..... - (1)

1c) sur feuilles et tiges/ en été/nécrose des nervures par plages; chlorose générale du feuillage; déssèchement; nécroses brunes sur tige; flétrissement nécrotique de la plante. (="black root").....

1d) sur gousses / gousses marbrées déformées

ou gousses fortement arquées; nécrose brun noir le long des sutures, dessèchement (="black root").

---

(1) MOSAIQUE COMMUNE DU HARICOT (BCMV)
(1c & 1d) = black root : également southern bean mosaïc virus

1c) : souches de la nécrose du tabac (stipple streak)

(+) en caractères majuscules : virus reconnus ousoupçonnés EN FRANCE
en caractères minuscules : autres virus

2a) sur feuilles / mosaïque plane par petites taches ou larges plages jaune vif, pas de déformation .....

2b) sur feuilles de la base / taches chlorotiques petites quelquefois annulaires, très nombreuses, à tendance nécrotique .....

2c) sur jeunes feuilles / chlorose générale du feuillage avec forte frisolée; feuilles gaufrées enroulées sur les bords et nécrose de la nervure médiane et quelquefois des petites nervures.....

2d) aspect de la plante / plante fortement rabougrie d'aspect buissonnant .....

2e) sur gousses / déformations; zones vertes déprimées....

} (2)

----------(2) MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT (BYMV) ET SOUCHES.

(2c & 2d) souches necrotiques du BYMV; (2e) souches "pod distorting", "necrotic lesion" du BYMV

----------(2) Souches systémiques du virus de la mosaïque de la Luzerne

3a) sur gousses / taches rougeâtres irrégulières déprimées ou taches annulaires; déformations .....

3b) sur la plante entière / manifestation nécrotique généralisée.....

} (3)

----------(3) SOUCHES DE LA NECROSE DU TABAC (Stipple streak)
SOUCHES NECROTIQUES DU BYMV (severe yellow)
Souche "Yellow dot" de la mosaïque de la luzerne
Souche "Red node" du streak du tabac..

TABLEAU II

Identification des virus du haricot transmis par la semence, par utilisation des variétés différentielles

VARIETES	SOUCHES DU VIRUS DE LA MOSAIQUE COMMUNE								WBMV
	BCMV type	N Y 15 BURKHOLDER	Voldagsen FRANDSEN	Marienau FRANDSEN	Souche de DEAN	GN 123 DEAN	Souche de ZAUMEYER GOTH	Souche de SNOW	Skotland Burke
ROBUST	R	S	S						
MICHELITE	R	S	(LL)	(LL)					
TOP CROP	R (Hyp)	R (Hyp)				R (Hyp)	R	S	R
RED MEXICAN UI 3	R					S		S	
RED MEXICAN UI 34	R		(LL)	(LL)	S				(LL)
GREAT NORTHERN UI 123	R	R			R	S			S
GREAT NORTHERN UI, 31 81	R	R				S			(LL)
PINTO UI 11,72,78	R	S				S			(LL)
PUREGOLD	R				S	S			
IMPROVED TENDERGREEN	S				R	S			S
WACHS RHEINLAND			S	R					

S = Sensible ; R = Résistant ; (LL) = lésions locales

(Hyp) = Hypersensibilité (Black-root

TABLEAU III

Identification par NOTES DIFFERENTIELS de quelques virus pouvant infecter le HARICOT

Les réactions du haricot cultivé, après l'inoculation mécanique des virus auxquels cette espèce est sensible, sont de deux types :

1) Des réactions locales sur feuilles inoculées (lésions circulaires chlorotiques ou nécrotiques, ringspot, nécrose des nervures).
2) Des réactions systémiques (mosaïque, chlorose, nécrose généralisée.).

Cette distinction n'est utilisable pour l'identification des isolements que dans la mesure ou la variété inoculée est précisée car les réactions à l'inoculation d'un même virus sont très différentes selon cette variété.

Par suite, il est préférable, dans un essai de clef de détermination, de prendre pour base les réactions d'autres plantes hôtes (tabac, pois, Vigna sinensis) et de reporter les réactions différentielles des haricots après avoir séparé les grands groupes de virus.

TABLEAU III

TABAC	POIS	
pas de réaction	pas de réaction apparente sur aucune variété	MOSAIQUE COMMUNE DU HARICOT (BCMV) Southern bean mosaïc (SBMV) Pod mottle TABLEAU III A
	une réaction systémique sur plusieurs variétés	MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT (BYMV) Yellow stipple. Virus de la fève et des trèfles New Zealand pea streak TABLEAU III B
une réaction plus ou moins nécrotique locale et/ou systémique		VIRUS INFECTANT LES SOLANEES TABLEAU III C

NB - Les virus présents en France sont en caractères majuscules.
Les virus rencontrés naturellement sur le haricot cultivé sont soulignés.

TABLEAU III A

SOJA	VIGNA SINENSIS		REACTIONS DES HARICOTS		
			LOCALE SEULE	SYSTEMIQUE SEULE	LOCALE ET SYSTEMIQUE
pas de réaction	pas de réaction	MOSAIQUE COMMUNE DU HARICOT (BCMV)		(MD) la plupart des variétés sensibles	(VN) (TN) les variétés hypersensibles Top Crop
une infection systémique	lésions locales et infection systémique	Southern bean mosaïc (SBMV)	(NLL) Pinto GN I23 (+) K.Wonder (+)	(m, Stu) Top Crop	(LL) (Ste) Blue Lake
		Severe bean mosaïc (++) (SBMV)			(NLL) (M) la plupart des variétés (VN)(M): Pinto (RSP) (M) : Michelite
		Pod mottle			(NLL) (M) Cutshort Pink Pinto K. Wonder

(++) le virus qui serait une souche du SBMV est latent dans le pois

(+) GN = Great Northern; K.Wonder = Kentucky Wonder

TABLEAU III B

POIS	VIGNA			
réaction systémique sur la variété	réactions locales et/ou systémique	Yellow stipple	(M TN) Michelite Pinto GN I23 (m) Abondance Top Crop	
	pas de réaction	Souche 15-B du BYMV	(M) la plupart des variétés	

			MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT (BYMV)		(M) la plupart des variétés	(LL) (M) sur quelques variétés
	pas de réaction		"Pod distorting strain"			
réaction systémique sur plusieurs variétés sauf Perfection Horal			"Souche Voldagsen"		(TN) Abondance Pinto Michelite	
			"X - strain"		(M) Michelite TN K. Wonder	
			"pea strain"		((M) Michelite	(LL) (TN) Blue lake (VN) (TN) Blue Lake
	Réactions locale et systémique		Souche Vigna du BYMV		(M) la plupart des variétés	

TABLEAU III C

SOLANEES peu de plantes hôtes en dehors des légumineuses			Certaines souches du BYMV			
			" Necrotic strain"	(NLL) G.N. I23	(M) Abondance Top Crop	(NLL) (M) Pinto, Robust K. Wonder
			"Severe yellow mosaïc"			(NSP,VN) la plupart des variétés
beaucoup d'hôtes parmi les autres familles notamment les solanées	NICOTIANA GLUTINOSA une réaction systémique		Souches de la mosaïque de la luzerne			
			"Yellow dot"		(M) Abondance Top Crop	(NV,RSp) Pinto, Blue Lake K. Wonder
			" Severe yellow mosaïc"			(NSP, VN) la plupart des variétés
			SOUCHE DE LA NECROSE DU TABAC "stipple-streak"			(NV,TN) la plupart des variétés
	pas de réaction		SOUCHE DU STREAK DU TABAC "RED NODE" du haricot			(RSp, TN) Pinto, K.Wonder

VIRUS DU POIS

TABLEAU IV

Principaux types de symptômes de maladies à virus OBSERVES EN FRANCE sur le POIS CULTIVE

1a) sur feuilles / zones translucides au voisinage des nervures, mosaïque très déformante
excroissances foliacées à la face inférieure (énations .....
1b) sur cosses / déformations, marbrure, énations ..... (1)

1c) aspect de la plante / très net rabougrissement ; rosette terminale .....

(1) MOSAIQUE ENATION DU POIS (PEMV)

2a) sur feuilles / très net éclaircissement des nervures ; mosaïque par plages; marbrure
pas de déformation ..... (2)

2b) sur feuilles / mosaïque par petites taches vert foncé sur le limbe chlorosé ;
déformations et frisolée .....

(2) MOSAIQUE COMMUNE DU POIS (PCMV)
MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT (BYMV)

3a) sur feuilles / chlorose generalisée ; enroulement marginal, nervures vertes; feuillage cassant.
ponctuations nécrotiques .....

3b) sur tige / nécrose interne vasculaire, principalement au collet ..... (3)

3c) aspect de la plante / port érigé; croissance terminale fortement ralentie ; nanisme .....

(3) JAUNISSE APICALE DU POIS

4a) sur feuilles / marbrure diffuse ou par plages larges éclaircissement des nervures ; enroulement .....

4b) aspect de la plante / rabougrissement par raccourcissement très net des entrenoeuds terminaux ; flétrissement.. (4)

(4) MOSAIQUE DES NERVURES DU TREFLE VIOLET (RCVMV)
MOSAIQUES DE LA FEVE

5a) sur feuilles / chlorose généralisée : flétrissement mou;
nécrose brune des nervures par plages .....

5b) sur feuilles / taches nécrotiques brunes, petites et
nombreuses ; déformations ; frisolée et nanisme ...

5c) sur tige / nécrose brun noir ou violacée, longitudinale
torsion de la tige, (= "streak").....

5d) sur cosses / taches nécrotiques brun violacé , quelque-
fois en anneaux ; déprimées.
coloration violette uniforme, cosses plates.....

5e) aspect de la plante / flétrissement apical nécrotique ;
nanisme ; rosette terminale, pousses axillaires
déformées et nécrosées .....

(5)

(5) LES VIRUS DES STREAK DU POIS (PSV)
BRUNISSEMENT PRECOCE DU POIS (PEBV)
SOUCHES DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU CONCOMBRE (CMV)
Souches du virus de la mosaïque de la luzerne (AMV)
STREAK et nécrose DU TABAC
Spotted wilt de la tomate.
Mosaïque de la betterave.
COMPLEXES RCVMV + PCMV ou RCVMV + BYMV

TABLEAU V

Identification par HOTES DIFFERENTIELS de quelques virus pouvant infecter le POIS

TABLEAU V A

TABAC	HARICOT	
pas de réaction	pas de réaction	(Mosaïque sur EPINARD) — MOSAIQUE DE LA BETTERAVE MOSAIQUES DU POIS (PEMV, PCMV) MOSAIQUE DES NERVURES DU TREFLE VIOLET (RCVMV) STREAK DU POIS TABLEAU V B
pas de réaction		MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT (BYMV) Virus des trèfles et de la fève TABLEAU III B
		"New Zealand pea streak"
une réaction plus ou moins nécrotique	pas de réaction	BRUNISSEMENT PRECOCE DU POIS (PEBV) SOUCHES du STREAK du tabac de la mosaïque de la luzerne (AMV) de la MOSAIQUE du CONCOMBRE (CMV) TABLEAU V D
	pas de réaction	PO - PSV MOSAIQUE DU CONCOMBRE (CMV) Spotted wilt de la tomate TABLEAU V E

TABLEAU V B

POIS	POIS	
Symptômes de mosaïques (nécroses plus rares)	pas de réaction sur les var. Perfection Horal	MOSAIQUE COMMUNE DU POIS (PCMV)
	mosaïques et enations sur Perfection Horal	MOSAIQUE EMATION DU POIS (PEMV)
rabougrissement et flétrissement	VIGNA	MOSAIQUE DES NERVURES DU TREFLE VIOLET (RCVMV)
		Erbsenstauche virus (EKV)
symptômes nécrotiques	pas de réaction	STREAK DU POIS
		TABLEAU V C
	une réaction locale nécrotique	MS - PSV

TABLEAU VC

VICIA VILLOSA	LENTILLE	TREFLE BLANC	
pas de réaction apparente	pas de réaction		Streak du pois du Wisconsin (WPSV)
	Rabougrissement et flétrissement	une réaction systémique	Steinklee virus (SKV)
			Souche I5 de Idaho (PSV-I5)
réaction locale et nécrose systémique		pas de réaction	Pea streak-Idaho (PSV-Idaho)

TABLEAU VI

1a) sur feuilles / mosaïque diffuse avec taches chlorotiques; nanisme et enroulement des folioles .....

1b) sur feuilles / mosaïque vert foncé en îlôts bien délimités ; au voisinage des nervures; "vein banding" feuilles légèrement crispées au sommet ..... (1)

- - - - - - - - - - - - (1) MOSAIQUE COMMUNE DU POIS (BCMV)
MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT (BYMV)

2a) sur feuilles / chlorose générale du feuillage ; enroulement marginal ; nervures vertes ; feuilles cassantes .....

2b) aspect de la plante / nanisme ; port érigé .....; (2)

- - - - - - - - - - - - (2) JAUNISSE APICALE DU POIS

3a) sur feuilles / taches nécrotiques brun rouge, larges quelquefois zonées; petites taches nécrotiques sur les jeunes feuilles; chlorose ; mosaïque nécrotique et déssèchement partiel .....

3b) sur tige / nécroses longitudinales brunes (=streak"); torsion de la tige ,..... (3)

- - - - - - - - - - - - (3) SOUCHES NECROTIQUES DU BYMV
SOUCHES DE LA MOSAIQUE DE LA LUZERNE (AMV)

4) sur feuilles / mosaïque diffuse; éclaircissement intense de nervures sur certaines feuilles; recovery temporaire, déssèchement partiel..... (4)

- - - - - - - - - - - - (4) MOSAIQUE VRAIE DE LA FEVE (EAMV)

TABLEAU VII

Utilisation des HOTES DIFFERENTIELS dans l'identification des virus pouvant infecter la FEVE.

N.B. - La plupart des virus infectant le haricot et le pois, mentionnés dans les tableaux précédents peuvent, expérimentalement infecter la fève. On ne fera figurer dans le tableau ci-dessous que ceux rencontrés sur la fève dans les conditions naturelles.

TABLEAU VII A

TABAC	POIS	
une réaction locale et systémique	une réaction sur toutes les variétés dont Perfection	MOSAIQUE DE LA LUZERNE (TABLEAU IX C)
pas de réaction		VIRUS DE LA FEVE
	pas de réaction sur Perfection	MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT (BYMV) (TABLEAU III B)
		MOSAIQUE COMMUNE DU POIS (PCMV)

TABLEAU VII B

TREFLE VIOLET	
une mosaïque systémique	Broad bean mottle (BBMV)
pas de réaction	MOSAIQUE VRAIE DE LA FEVE (EAMV)

VIRUS DES LUZERNES ET DES TREFLES

TABLEAU VIII

Principaux types de symptômes de maladies à virus OBSERVES EN FRANCE sur les TREFLES et les LUZERNES.

1a) TREFLE BLANC / sur feuilles / chlorose générale du feuillage, nanisme des folioles; coloration rougeatre du bord des feuilles .....

1b) TREFLE BLANC / sur fleurs / transformation des pièces florales en éléments foliacés verts ; (= phyllodie)... } (1)

= - - - - - - - - - - - - (1) PHYLLODIE DU TREFLE
= PETALES VERTS DU FRAISIER

2) LUZERNE CULTIVEE / sur feuilles / très net éclaircissement des nervures qui apparaissent en jaune vif sur le limbe vert de la feuille ; rabougrissement ..... (2)

- - - - - - - - - - - - - - - (2) JAUNISSE APICALE DU POIS

3a) LUZERNE CULTIVEE & LUPULINE /sur feuilles/ mosaïque plus ou moins diffuse par plage ; enroulement et nanisme des folioles ; chlorose .....

3b) TREFLES / sur feuilles/ mosaïque plane en streak jaune vif parallèle aux nervures secondaires de la foliole.. } (3)

3c) TREFLE VIOLET / sur feuilles / frisolée avec mosaïque par petites taches circulaires à tendance nécrotique très fort rabougrissement .....

- - - - - - - - - - - - - - (3) MOSAIQUES DES TREFLES
MOSAIQUE DE LA LUZERNE
MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT

TABLEAU IX

Identification par HOTES DIFFERENTIELS des virus pouvant infecter les TREFLES et la LUZERNE

(avec mention des souches de AMV rencontrées sur haricot et sur pois)

TABLEAU IX A

TABAC	HARICOT	
	pas de réaction	MOSAIQUE DES NERVURES DU TREFLE VIOLET (RCVMV)
pas de réaction		MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT (BYMV) VIRUS DES TREFLES (WCMV, CYMV, RCMV)
	une réaction locale et/ou systémique	TABLEAU IX B
Réaction nécrotique locale ou systémique		MOSAIQUE DE LA LUZERNE (AMV) Souche de la mosaïque du concombre (CMV) TABLEAU IX C

TABLEAU IX B

	CONCOMBRE	CHENOPODIUM	
réaction systémique sur toutes les variétés	lésions locales chlorotiques	réaction locale et systémique	MOSAIQUE JAUNE DU TREFLE (CYMV)
		pas de réaction	MOSAIQUE DU TREFLE BLANC (WCMV)
	pas de réaction		RED CLOVER MOTTLE VIRUS (RCMV)

POIS	
pas de réaction sur les variétés Perfection Horal	MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT (BYMV) TABLEAU III B

TABLEAU IX C

HARICOT var. ABONDANCE		
REACTION LOCALE	REACTION SYSTEMIQUE	
lésions locales nécrotiques	pas de réaction	MOSAIQUE DE LA LUZERNE (AMV - TYPE) SOUCHE COLMAR Local lésion alfalfa mosaïc Souche Yellow patch et 425 des trèfles TABLEAU IX D
	mosaïque systémique	Alfalfa yellow mosaïc (AYMV)
	nécrose systémique	Souches nécrotiques de AMV Alfalfa N ; vein necrosis virus (VNV)
pas de réaction locale nécrotique	mosaïque systénique	Systemic alfalfa mosaïc Souches systémiques de AMV Yellow dot ; Yellow spot mosaïc (YSMV) Idaho alfalfa mosaïc (IAMV) Souche de la mosaïque du concombre (CMV) TABLEAU IX E

TABLEAU IX D

CONCOMBRE	FEVE	
une réaction systémique	réaction nécrotique locale et/ou systémique	MOSAIQUE DE LA LUZERNE (AMV - TYPE) Local lésion strain Souche 425 du trèfle violet
	pas de réaction	SOUCHE COLMAR de AMV
pas de réaction		Yellow patch virus

TABLEAU IX E

CONCOMBRE	TREFLE BLANC	
lésions locales et mosaïque systémique	pas de réaction	SOUCHE DE LA MOSAIQUE DU CONCOMBRE (CMV)
	Mosaïque systémique	Yellow dot virus
pas de réaction		Yellow spot mosaïc (YSMV)
	pas de réaction	Idaho alfalfa mosaïc (IAMV)

VIRUS DU HARICOT

MOSAIQUE COMMUNE DU HARICOT

BEAN COMMON mosaïc virus = BCMV ; (STEWART et REDDICK 1919)
Marmor phaseoli, (HOLMES)

Hôte naturel : Le haricot.

Hôtes différentiels :

(++ par inoculation mécanique) :

Haricot : var. Princesse nain double de Hollande, Abondance, Triomphe de Farcy, Beka :
Eclaircissement général des nervures, mosaïque verte systémique avec déformations : vein banding; enroulement.
var. Pinto, Michelite,
lésions locales chlorotiques puis nécrotiques quelquefois tardives - nécrose systémique partielle ou chlorose.
var. résistantes : Red Mexican, Top Crop, Robust, Great Northern UI N° 123.

(++ par inoculation mécanique sur feuilles isolées placées en chambre humide à 32° C) :

Haricot : var. Top Crop
lésions locales nécrotiques et nécrose des nervures (4 jours)

++ haricots non inoculés issus de semence infectée

Le virus est inféodé au genre Phaseolus; il infecte les espèces, .
P. calcaratus, P. mungo.

SOUCHES DU VIRUS DE LA MOSAIQUE COMMUNE DU HARICOT

Les sensibilités variétables du haricot ont permis de différencier plusieurs souches du virus; les variétés utilisées par les auteurs américains ou allemands ne sont pas toujours cultivées en France ; elles restent néanmoins les seules variétés de référence utilisables pour une identification valable.

A - Souche New York 15 (= souche de BURKHOLDER,1943)
infecte Robust, Michelite, Pinto U I 72, U I 78 et U I 111.
B - Souche Voldagsen (FRANDSEN 1952)
infecte Robust, Wachs Rheinland; lésions locales en anneaux sur Michelite, Red Mexican U I 34.
C - Souche Marienau (FRANDSEN, 1952)
infecte Robust ; lésions locales sur Michelite et Red Mexican U I 34
var. résistante Wachs Rheinland.

.../...

D - Souche hollandaise "W"(VAN DER WANT, 1954).
forte mosaïque avec nécrose apicale sur var. Beka.
E - Souche de DEAN (DEAN et coll. 1959).
infecte Red Mexican U I 34 et Puregol.,
var. résistante : Improved Tendengren.
F - Isolement G N 123 (DEAN et coll, 1959).
infecte les haricots Great Northen (dont U I I23), Pinto,
Puregold et Improved Tendergreen.
G - Souche de ZAUMEYER et GOTH, 1962 :
très forte mosaïque sur les variétés sensibles; pas de réaction
d'hypersensibilité chez Top Crop.

AUTRES VIRUS DU HARICOT, TRANSMIS PAR LA SEMENCE (MOSAIQUES)

ISOLEMENT DE SNOW, 1955

Hôtes naturels : le haricot, le glaïeul

Hôtes différentiels :
Haricot var. Abondance : Top Crop, Red Mexican U I 3.
Symptômes identiques à ceux du BCMV.

Autres hôtes : Les trèfles hybride et souterrain (M), le glaïeul
Le virus ne semble pas infecter la fève, les trèfles violet et blanc, les melilots.

WESTERN BEAN MOSAIC VIRUS = WBMV; (SKOTLAND et BURKE,1961)

Hôtes différentiels :
Haricot var. Great Northern U I I23, Improved Tendergreen :
symptômes identiques à ceux du BCMV
var. Great Northern U I 3I, Red Mexican U I 34,
Pinto U I 11 : nécroses locales des nervures.
var. résistantes : Top Crop, Michelite.

Autres hôtes : Phaseolus lunatus, Vigna sinensis, le pois chiche
(M, Stu, N)
Le virus ne semble pas infecter la fève, le pois et les melilots.

VIRUS LATENTS DU HARICOT (HAMPTON, 1962)

Hôte naturel : Haricot var. Black Turtle.

Hôtes différentiels :
isolement 1) Haricot var. Black Turtle : mosaïque des nervure
et nanisme
isolement 2) Haricot var. Michelite : marbrure systémique.
isolement 3) Haricot var. Bountiful, Vigna sinensis :
lésions locales du type "Ringspot".
Les virus infectent le tabac (M), le datura, la fève, le concombre, Gomphrena globosa (LL).

SOUTHERN BEAN MOSAIC 2 - (ZAUMEYER & HARTER, 1943)

(voir "souches du Southern bean mosaïc virus)

MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT
BEAN YELLOW MOSAIC VIRUS = BYMV (PIERCE,1934)
Marmor manifestum (FRANDSEN)

Hôtes naturels : le haricot, le pois, la fève, les vesces, les trèfles hybride, incarnat et souterrain, la luzerne lupuline, le glaïeul.

Hôtes différentiels

- Haricot : var. Corbett Refugee, Robust, Great Northern, Top Crop (résistantes au BCMV); les variétés sensibles au BCMV :
  réaction locale variable par lésions chlorotiques ou nécrotiques, réaction systémique : petites taches chlorotiques nombreuses (1-3mm) avec halo, devenant coalescentes; folioles tournées vers le bas; mosaïque jaune très contrastée avec chlorose généralisée; frisolée; nanisme; aspect buissonnant de la plante qui développe des pousses axillaires déformées.
  Quelquefois une nécrose systémique des nervures.
- Pois : var. Alaska, Alderman, Petit Provençal :
  flétrissement des feuilles inoculées.
  réaction systémique : très net éclaircissement des nervures, taches chlorotiques; marbrure avec ilots vert foncé.
  pas ou peu de déformation; pas de rabougrissement de la plante.
  var. résistantes : Horal, Perfection, Pride, Juwel, New Era, New Season, New Wales, Bonneville.
- Fève :
  éclaircissement des nervures : taches chlorotiques; mosaïque.
  inclusions cristallines intracellulaires.
- Chenopodes :
  Ch. amaranticolor : lésions locales très petites, (moins de 1 mm), chlorotiques ou brun rougeâtre se prolongeant le long des nervures.
  Ch. Quinoa : lésions locales diffuses chlorotiques avec tache centrale jaune brun; pas d'infection systémique.

Autres hôtes : les trèfles hybride et incarnat (M, Stu), le trèfle souterrain, les vesces, le soja, le fenu grec, la luzerne lupuline, le melilot ; le glaïeul (M,FB) Gomphrena globosa (LL).

Le virus type de PIERCE, n'infecte pas le trèfle violet, Phaseolus lunatus, Vigna sinensis; pas d'hôte dans la famille des solanées.

.../...

SOUCHES DU VIRUS DE LA MOSAIQUE JAUNE DU HARICOT

Il existe beaucoup de souches différentes par leur symptomatologie, de l'isolement initial de PIERCE. Les principales sont les suivantes :

X-STRAIN (MC. WHORTER, 1946).

Hôtes différentiels :

- Haricot : var. Blue Lake
  lésions locales nécrotiques
  réaction systémique : coloration rouge de la base des folioles; chlorose; nécroses brunes des nervures; nécrose apicale.
- Trèfle violet, trèfle incarnat, fève :
  mosaïque jaune

POD DISTORTING STRAIN (GROGAN & WALKER, 1948)

Hôtes différentiels

- Haricot : var. Robust, Pinto, Michelite, Abondance.
  mosaïque systémique nécrotique; rabougrissement; déformation des gousses; nécrose apicale.
  var. résistantes : Great Nothern UI 59, UI 81, UI 123.
- Trèfle incarnat :
  éclaircissement des nervures; mosaïque douce; pas de rabougrissement.

Le virus ne semble pas infecter le trèfle violet, le trèfle blanc, la fève, les vesces, les melilots, Phaseolus lunatus.

PEA STRAIN N°1 (HAGEDORN & WALKER, 1950)

Hôte naturel : le pois

Hôtes différentiels :

- Pois : var. Perfected Wales :
  pas d'éclaircissement des nervures
  mosaïque systémique très sévère
- Haricot : var. Blue Lake
  nécrose locale des nervures.
  nécrose systémique; déformation des feuilles; rabougrissement
  var. Michelite
  mosaïque systémique jaune en petites taches.
- Trèfle violet :
  éclaircissement des nervures et mosaïque.

Le virus ne semble pas infecter le trèfle blanc, la luzerne ; Vigna sinensis.

.../...

SOUCHE VOLDAGSEN (FRANDSEN, 1952)

Hôtes différentiels :

- Haricot : var. Robust, Michelite
  mosaïque jaune
  var. Kentucky Wonder :
  nécrose systémique généralisée.

Autres hôtes : Phaseolus lunatus, la fève, le pois, le trèfle hybride, le trèfle incarnat, le soja, le lupin, la lentille.

Le virus ne semble pas infecter le trèfle violet, le trèfle blanc; Vigna sinensis.

NECROTIC STRAIN (ZAUMEYER & FISCHER, 1953)

Hôtes différentiels :

- Haricot : lésions locales nécrotiques circulaires
  ou nécrose des nervures et flétrissement de la feuille inoculée.
  pas d'infection systémique
  ou mosaïque jaune intense
  var. Great Northern UI 16, UI 3I, UI I23 :
  réaction locale seule.
  var. Abondance, Top Crop, Contender :
  réaction systémique seule.
  var. Great Northern UI 15, Red Mexican UI 3, Pinto UI 72; Robust, Kentucky Wonder :
  réactions locales et systémiques.
- Phaseolus lunatus :
  anneaux nécrotiques blanchâtres, locaux.
  réaction systémique du type "oak-leaf".
- Fève :
  lésions locales brun rouge bien marquées
  nécrose systémique.
- Vigna sinensis;
  lésions locales brun rouge, très petites.
  mosaïque systémique diffuse.
- Tabacs :
  Nicotiana tabacum :
  lésions locales en anneaux blanchâtres (8 mm)
  Nicotiana rustica :
  Lésions locales en larges anneaux jaunes.

Autres hôtes : le mélilot blanc (m), le soja (m), Vigna sesquipedalis.

Le virus ne semble pas infecter le pois, les trèfles violet, blanc et incarnat, la luzerne; Nicotiana glutinosa, le concombre.

.../...

SEVERE YELLOW MOSAIC (THOMAS & ZAUMEYER, 1953)

Hôtes différentiels :

- Haricot : var. Blue Lake, Kentucky Wonder :
(5-6 jours) lésions locales larges ; nécrose des nervures et chlorose de la feuille inoculée.
nécrose systémique généralisée et flétrissement
var. Great Northern UI15, Pinto UI 72, Michelite :
lésions locales rougeatres et nécrose des nervures.
enroulement des folioles; mosaïque jaune par petites taches; rabougrissement.
var. Abondance, Contender, Tendergreen.
chlorose des feuilles inoculées; pas de nécrose marbrure systémique et rabougrissement.
var. résistantes : Great Northern UI 16, UI 31 UI 123
- Pois : var. Thomas Laxton, Perfected Wales
éclaircissement des nervures ; mosaïque jaune léger vein banding ; streak nécrotique sur tige.
Var. résistante : Wisconsin Perfection.
- Tabacs :
Nicotiana tabacum, N. rustica, N. sylvestris :
(6-8 jours) lésions locales chlorotiques (1-3mm)
pas d'infection systémique apparente.

Autres hôtes : La fève, le soja (m) le melilot blanc (m), le trèfle incarnat (M, Stu) le trèfle blanc (m): Vigna sesquipedalis (m).

Le virus ne semble pas infecter le trèfle violet, la luzerne, Phaseolus lunatus.

SOUCHE NECROTIQUE DE HOUSTON & OSWALD, 1953

Hôte naturel : le trèfle blanc.

Hôtes différentiels :

- Trèfle blanc :
mosaïque jaune des nervures

- Haricot : var. Abondance, Great Northern UI 15, Pinto UI 11
(7-10 jours) enroulement de folioles nécrose systémique des feuilles et des pétioles; mosaïque; nécrose apicale; déformation des gousses.
var. résistantes : Great Northern UI 16 - UI 59, U.I I23
- Fève : mosaïque jaune vif très marquée; rugosité du feuillage.

Le virus ne donne pas de symptôme sur la luzerne.

.../...

STRAIN I5-B (SCHROEDER & PROVVIDENTI, 1959)

Hôte naturel : le pois

Hôte différentiel

- Pois : var. Perfection, Bonneville
  symptômes typiques du BYMV.

SOUCHE DU VIGNA (BRIERLEY & SMITH, 1962)

Hôte naturel : Vigna sinensis, le glaïeul

Hôtes différentiels :

- Vigna sinensis ; var. Black
  lésions locales vert clair
  marbrure systémique, nécrose sur tige et nécrose apicale.
- Chenopodes :
  Chenopodium amaranticolor :
  mosaïque en très petites taches jaunes, nombreuses

Le virus infecte le glaïeul (M. FB).

SOUTHERN BEAN MOSAIC VIRUS = SBMV (ZAUMEYER & HARTER 1943)
MARMOR LAESIOFACIENS

Hôte naturel : le haricot

Hôtes différentiels :

- Haricot : var. Pinto, Great Northern 123, Kentucky Wonder
  lésions locales rouges angulaires, le long des petites nervures;
  flétrissement des feuilles inoculées.
  pas de symptômes systémique net.
  var. Valentine, Top Crop :
  chlorose systémique avec frisolée ; rabougrissement, aspect buissonnant, marbrure dur gousses.
  var. Blue Lake :
  réaction locale nécrotique, diffuse ou en petites lésions; nécrose systémique, folioles dirigées vers le bas, streak sur tige.

Le virus infecte le soja (m), Phaseolus lunatus (LL), qui seraient les seules légumineuses sensibles, avec le haricot.

.../...

SOUCHES DU SOUTHERN BEAN MOSAIC VIRUS

SOUTHERN BEAN MOSAIC 2 (ZAUMEYER & HARTER, 1943) MARMOR LAESIOFACIENS VAR. MINOR

Hôtes différentiels :

- Haricot : Symptômes locaux plus nets que ceux du virus type.

- Haricot issu de semence infectée.

SEVERE BEAN MOSAIC VIRUS = Sv BMV (YERKES & PATINO 1960) Marmor mexicanum

Hôte naturel : le haricot

Hôte différentiel :

Haricot var. Pinto 1534
Nécrose locale des nervures.
marbrure systémique
var. Michelite, Red Kidney, Canilac.
taches locales en ringspot.

BEAN POD MOTTLE VIRUS (ZAUMEYER & THOMAS, 1948) MARMOR VALVOLARUM

Hôtes naturels : Le haricot, le soja

Hôtes différentiels :

Haricot var. Cutshort, Shutter Pink, Idaho Refugee, Pinto, Kentucky Wonder, Contender, Tendergreen.
(3-4 jours) lésions locales rouges identiques à celles du SBMV.
quelquefois mosaïque systémique; marbrure sur gousses.
var. Michelite, Blue Lake.
réaction locale seule.
Vigna sinensis : var. Black
nécrose locale des nervures et taches en Ringspot
taches chlorotiques systémiques et nécroses.

Autres hôtes : Le soja (M, Stu), le trèfle incarnat (m v), Phaseolus lunatus (LL) Lespedeza, sp. (m), Stizolobium deeringianum (TN)

Le virus ne semble pas infecter le pois, la fève, les trèfles violet et blanc, la luzerne.

BEAN YELLOW STIPPLE VIRUS (ZAUMEYER & THOMAS,1950) MARMOR FLAVOPUNCTUM

Hôtes naturels : le haricot, le soja

Hôtes différentiels :

- Haricot : var. Pinto 78, Great Northern 123, Robust, Michelite :
  mosaïque systémique d'abord diffuse.
  mosaïque jaune vif en petites taches ; nécroses sur tige.
  var. Abondance, Top Crop
  mosaïque diffuse
- Pois
  éclaircissement des nervures, marbrure
  var. Perfection :
  marbrure et nécroses sur tige
- Vigna sinensis :
  lésions locales nécrotiques
  marbrure systémique.

Le virus ne semble pas infecter la fève, les trèfles, les melilots, la luzerne.

VIRUS DU POIS

MOSAIQUE ENATION DU POIS
PEA ENATION MOSAIC VIRUS = PEMV (OSBORN, 1935)
Marmor pisi, (HOLMES)

Hôtes naturels : Un grand nombre de légumineuses dont le pois, le pois de senteur, les trèfles.

Hôtes différentiels :
(par inoculation mécanique quelquefois difficile)

Pois : var. Horal, Perfection, Bonneville, New Era, Téléphone nain, Perfected Wales.
éclaircissement des nervures avec aires hyalines translucides; mosaïque très déformante avec enroulement et déformation des folioles; rabougrissement et croissance terminale en rosette. excroissances à la face inférieure des feuilles et des stipules (énations), quelquefois sur les gousses qui sont déformées; nécroses partielles.

Pois de senteur :
mosaïque forte avec énations; taches translucides; rabougrissement et flétrissement.

Fève :
taches translucides au voisinage des nervufes quelquefois des enations; rabougrissement.

Autres hôtes : Parmi les légumineuses : les trèfles blanc (Stu) hybride (VC ou Lat) incarnat (Stu, énations) la luzerne (VC ou Lat) la vesce cultivée (m) Vicia villosa (m) le soja (m,D) le pois chiche. Le haricot réagit rarement par des taches chlorotiques locales et systémiques.
Le virus ne semble pas infecter le trèfle violet, la luzerne lupuline, le melilot blanc.

ISOLEMENTS

Plusieurs isolements du virus, de différentes origines (USA) provoquent des symptômes variables sur le pois et la fève, utilisés comme hôtes différentiels. Pour certains d'entre eux, les manifestations sur le pois var. Perfected Wales, sont beaucoup plus sévères avec des énations de grande taille (10-12mm). La réaction de la fève varie également de la marbrure diffuse à la mosaïque nécrotique. Ces différences ne permettent pas, cependant de définir de véritables souches du virus.

.../...

MOSAIQUE COMMUNE DU POIS
PEA COMMON MOSAIC VIRUS=PCMV (DOOLITTLE & JONES 1926)
Marmor leguminosarum (HOLMES)

Hôtes naturels : Un grand nombre de légumineuses dont le pois, la fève, le lupin, le trèfle violet.

Hôtes différentiels :

Pois : var. Alaska, Téléphone :
chlorose généralisée avec mosaïque diffuse
var. Alderman :
mosaïque jaune systémique avec ilôts vert foncé au voisinage des nervures; rabougrissement et déformations foliaires.
var. résistantes : Horal, Perfection, Onward, Hundredfold, Thomas Laxton, Little Marvel.

Lupin bleu, pois chiche :
chlorose généralisée et nécrose apicale rapide.

Fève :
chlorose, mosaïque systémique avec plages vert foncé.

Chenopodes :
Chenopodium amaranticolor :
(10 jours) taches chlorotiques locales.
taches jaunes systémiques le long des nervures, déformations.

Autres hôtes : Le pois de senteur (Chl, M, VB) les trèfles violet et incarnat (M), le trèfle hybride (VC,m) la vesce cultivée (M,LC) les mélilots (m).

Le virus ne semble pas infecter le haricot, le trèfle blanc, le soja, Vicia villosa, Vigna sinensis.

SOUCHES DE STUBBS (1937)

Trois souches ont été décrites :

Hôte différentiel : Pois var. Alderman :

1) MARBLE PEA MOSAIC VIRUS (2A) :
mosaïque par larges taches vert foncé
2) SPECKLE PEA MOSAIC VIRUS (2B) :
nombreuses petites taches jaunes
3) MILD PEA MOSAIC VIRUS (2C)
mosaïque diffuse.

.../...

JAUNISSE APICALE DU POIS
PEA TOP YELLOW VIRUS (QUANTZ & VÖLK, 1954

Hôtes naturels : le pois, la fève, la luzerne, les vesces.

Hôtes différentiels :

- transmis par le puceron vert du pois sur le mode persistant, non transmis mécaniquement.

Pois, Fève :
(1 mois) symptômes de chlorose identiques à ceux observés sur les plantes au champ : port érigé ; enroulement des folioles; feuilles cassantes, nécrose vasculaire.

Luzerne :
très net éclaircissement des nervures dont le réseau se détache en jaune vif sur le limbe vert.

Autres hôtes : Les vesces, les trèfles violet et blanc, le pois des champs.

PEA STREAK VIRUS 1 (ZAUMEYER & WADE, 1938)

Hôte naturel : le pois.

Hôtes différentiels :

Pois : var. Horal, Perfection, Alderman, Téléphone nain : éclaircissement des nervures; chlorose par plages; nécroses sur tige et croissance terminale en rosette, déformations des cosses.

Fève :
lésions locales brun rouge de type ringspot (3-5mm); nécrose des nervures, streak sur tige.

Autres hôtes : les trèfles violet (M) et incarnat (M), le melilot blanc (m), la vesce cultivée, le pois chiche, la lentille.

Le virus ne semble pas infecter le haricot, le soja, Vicia villosa, Vigna sinensis; les solanées.

.../...

NEW ZEALAND PEA STREAK VIRUS (CHAMBERLAIN, 1939)
Pisum virus 3
Marmor iners (HOLMES).

Hôtes naturels : le pois, le pois des champs, le pois de senteur

Hôtes différentiels :

Pois var. résistante : Little Marvel

Pois de senteur :
Streak sur tige, nécrose systémique avec flétrissement.

Haricot :
lésions locales nécrotiques
nécrose systémique et flétrissement

Concombre :
mosaïque diffuse

Autres hôtes : Les trèfles violet, blanc et hybride; Vicia villosa.

Le virus ne semble pas infecter la luzerne.

WISCONSIN PEA STREAK VIRUS = WPSV (HAGEDORN & WALKER 1949)

Hôte naturel : le pois

Hôtes différentiels :

Pois : var. Pride, Perfected Wales.
flétrissement des feuilles inoculées
chlorose systémique, streak; déformations foliaires; flétrissement; taches nécrotiques sur cosses.

Trèfle violet :
éclaircissement des nervures et mosaïque

Mélilots :
éclaircissement des nervures, taches chlorotiques en anneaux; mosaïque.

Soja :
chlorose systémique

Chenopodes
Chenopodium amaranticolor :
(5jours) lésions locales circulaires nécrotiques (2-4 mm)

Autres hôtes : le trèfle blanc (MD), le trèfle hybride (MD), la fève (Str) les Vesces. le virus est latent dans le pois de senteur, le trèfle incarnat, Vicia villosa.
Le virus ne semble pas infecter le haricot, la luzerne, la lentille, le pois chiche, Vigna sinensis.

SOUCHES DU WISCONSIN PEA STREAK VIRUS

IDAHO-STRAIN = PSV-IDAHO (ZAUMEYER & PATINO, 1959)

Hôtes naturels : le pois, la luzerne (?)

Hôtes différentiels :

Soja :
mosaïque forte avec vein-banding et petites taches jaune vif (yellow stipple).

Fève :
lésions locales nécrotiques brun noir
nécrose systémique et streak; flétrissement.

Vicia villosa :
lésions locales nécrotiques rougeâtres.
nécroses systémiques sur tiges.

Autres hôtes : le melilot blanc (m) le trèfle souterrain (m) le pois chiche (N,W), la lentille (W); Gomphrena globosa (LL).

Le virus ne semble pas infecter le haricot, les trèfles violet, blanc et hybride, la vesce cultivée , la luzerne (?), Vigna sinensis.

I 5 - ISOLATE = PSV - I-5 (KIM & HAGEDORN, 1959)

Hôte naturel : le pois

Hôte différentiel :

Luzerne : chlorose systémique et mosaïque en anneaux chlorotiques irréguliers.

Autres hôtes : la fève (LL,Str), les trèfles violet et incarnat (m) le trèfle hybride (Lat), le melilot blanc, la lentille (Stu)

Le virus ne semble pas infecter le haricot, le pois de senteur, le soja, le pois chiche, le trèfle blanc, Vicia villosa, Vigna sinensis.

.../...

STEINKLEE VIRUS = SKV (BRANDES & QUANTZ, 1958)
Virus du melilot

Hôtes différentiels :

Fève : lésions locales nécrotiques
nécrose systémique et flétrissement

Pois de senteur :
déformations foliaires, streak sur tige et flétrissement

Lentille :
éclaircissement des nervures, nécrose systémique et flétrissement

Chenopodes :
Chenopodium quinoa :
chlorose des feuilles inoculées.

Autres hôtes : les melilots (VC,m), le trèfle blanc (m), Vicia narbonensis (Chl Sp), Gomphrena globosa (LL). Le virus est latent dans les trèfles violet, hybride et incarnat, et dans Vicia villosa.

Le virus ne semble pas infecter le haricot, la luzerne, Vigna sinensis.

MS - PEA STREAK VIRUS = MS-PSV (KIM & HAGEDORN,1959)

Hôtes différentiels :

Pois : nécroses brunes des petites nervures, streak sur tige, chlorose et déformations des feuilles, flétrissement; taches nécrotiques sur cosses.

Pois chiche :
(quelques jours) streak et flétrissement de la plante

Vicia villosa :
éclaircissement des nervures et flétrissement.

Autres hôtes : le pois de senteur (Str) le trèfle blanc (m), la luzerne, le melilot, Vigna sinensis (LL); les trèfles violet et incarnat (Lat).

Le virus ne semble pas infecter le haricot, la fève, la lentille, le soja; il ne possède pas d'hôte en dehors de la famille des légumineuses.

.../...

P O - PEA STREAK VIRUS = PO - PSV (KIM & HAGEDORN, 1959)

Hôtes différentiels :

Pois : var. Perfected Wales.
nécrose apicale rapide; pousse axillaires d'apparence normale.

Zinnia :
mosaïque systémique

Autres hôtes : la fève (LL, Str) le pois de senteur (TH) le pois chiche (TH) les trèfles hybride et incarnat; les tabacs, la tomate (Lat).
Le virus ne semble pas infecter la luzerne, le haricot, les melilots, les trèfles violet et blanc, le soja.

BRUNISSEMENT PRECOCE DU POIS
PEA EARLY BROWNING VIRUS = PEBV (BOS & VAN DER WANT 1962)

Hôtes naturels : le pois, la fève, les trèfles, la luzerne

Hôtes différentiels :

Pois : var. Rondo, Juwel, Mansholt's Pluck :
nécrose partielle des nervures; flétrissement des feuilles, streak sur tige, nécrose apicale;

Haricot : var. Beka
(2-3 jours) lésions locales annulaires et nécrose des nervures.
var. Pinto, Top Crop, Saxa
lésions locales et taches chlorotiques systémiques.

Datura :
lésions locales en anneaux verts.

Petunia :
lésions locales (3mm) en anneaux concentriques bruns. marbrure systémique et rabougrissement.

Concombre :
lésions locales (2-3mm) chlorotiques sur cotylédons.
lésions locales jaunes sur feuilles inoculées.

Autres hôtes : le pois de senteur et la fève (Lat) Vigna Sinensis (LL) le tabac (LL et Lat) Nicotiana glutinosa (MD), Nicotiana glauca (LL,oak leaf) la tomate (Lat) Chenopodium amaranticolor (LL) Ch.Quinoa (LL,M) Gomphrena globosa (LL,M).
Le virus ne se transmet pas mécaniquement aux luzernes, aux trèfles et à la vesce cultivée bien que ces espèces semblent être infectées dans les conditions naturelles.

.../...

VIRUS DE LA FEVE
==========

BROAD BEAN MOTTLE VIRUS = BBMV (BAWDEN, CHAUDHURI & KASSANIS, 1951)

Hôtes naturels : la fève, les trèfles

Hôtes différentiels :

- Fève : (8-10 jours) éclaircissement des nervures; très forte mosaïque jaune avec rabougrissement; quelquefois des nécroses.
- Haricot : var. Canadian Wonder : (1 mois) taches chlorotiques locales (2mm) tardives. éclaircissement des nervures et mosaïque jaune systémique.
  var. Prince : marbrure diffuse (ou virus latent
- Pois de senteur : lésions locales sur feuilles inoculées marbrure systémique et fort rabougrissement ; flétrissement.
- Trèfles violet, blanc, incarnat: éclaircissement des nervures et mosaïque

Autres hôtes : le pois (m, Stu, W) la melilot blanc (m), le soja (11) Vicia narbonensis.

Le virus ne semble pas infecter la luzerne, le vesce cultivé; les solanées.

MOSAIC VRAIE DE LA FÈVE
ECHTE ACKERBOHNE MOSAIK VIRUS = EAMV (QUANTZ,1953)
Vicia varians

Hôtes naturels : la fève, les vesces, le pois, le pois chiche.

Hôtes différentiels :

- Fève : très net éclaircissement des nervures de type "arêtes de poisson"
  taches chlorotiques; "recovery" temporaire; quelques nécroses.
- Pois : (les variétés résistantes aux PCMV et BYMV sont sensibles).
  flétrissement des feuilles inoculées.
  éclaircissement des nervures; marbrure diffuse en taches vert clair le long des nervures; frisolée et enroulement; très net rabougrissement; nécroses brun clair sur tige; flétrissement.
- Melilots :
  taches vertes et jaunes en anneaux; frisolée; recovery.
- Haricot :
  taches chlorotiques locales diffuses (1-5mm) éclaircissement et nécrose des nervures en plages bien délimitées, taches déprimées sur gousses.
- Crotalaria spectabilis :
  taches vertes et jaunes en anneaux.

Autres hôtes : le pois de senteur (VC,M,FB) le trèfle incarnat (VC,M), les vesces (VC,M,Stu) le pois chiche (ChlSp,W), le lupin blanc (Chl,D,M).
Le virus ne semble pas infecter les trèfles violet, blanc et hybride, la luzerne lupuline, le soja.

SOUCHES

La souche forte EV11 provoque un flétrissement du pois inoculé; la souche EV14 ne donne qu'une frisolée; il existe également un mutant EV11M qui se différencie du virus type par des symptômes plus faibles.

VIRUS DE LA LUZERNE

MOSAIQUE DE LA LUZERNE
LUCERNE (ALFALFA) MOSAIC VIRUS = AMV (WEIMER,1934)
Marmor medicaginis (HOLMES) var typicum.

Hôtes naturels : le virus se rencontre dans de très nombreuses espèces les légumineuses, on peut citer ; le pois, la fève la luzerne, la luzerne lupuline, les trèfles.

Hôtes différentiels :

- Haricot :
  lésions locales petites, (0,5-2mm) nombreuses brun rouge.
  le virus type ne devient pas systémique.
- Fève :
  lésions locales rouges nécrotiques zonées.
  mosaïque systémique déformante; nécrose systémique des nervures; streak sur tige ; nécrose apicale.

- Vigna sinensis
  lésions locales brun rouge à bordure nécrotique; quelquefois lésions chlorotiques en anneaux.

- Tabacs :
  nécroses systémiques en arcs de cercle blanchâtres, en stries, en anneaux du type ringspot; éclaircissement des nervures; mosaïque déformante ; oak leaf; rabougrissement.

- Chenopodes :
  Chenopodium amaranticolor :
  (4-6 jours) lésions locales chlorotiques ou nécrotiques; nécrose systémique rapide avec déformations et rabougrissement.

Autres hôtes : La luzerne (M, Stu) le pois (Stu, W) le pois de senteur (LL, Stu, Str) le trèfle violet (m,D) ; le datura (Chl LL, m) le petunia (m) le celeri (M,vc) Ocimum basilicum (M ou Lat).

SOUCHES DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DE LA LUZERNE

De très nombreuses souches de la mosaïque de la luzerne ont été décrites. Etant donné la gamme d'hôtes très large de ce virus, certaines ont été isolées de plantes n'appartenant pas à la famille des légumineuses, comme le Marmor medicaginis var. solani (BLACK & PRICE, 1940) agent du calico de la pomme de terre, le Marmor medicaginis var. capsici (BERKELEY, 1947) rencontré sur le piment, et le tuber necrosis (OSWALD, 1950) sur pomme de terre.
On ne citera ici que quelques souches isolées de légumineuses.

.../...

ALFALFA VIRUS N (EG.WORTER, 1949)

Hôtes naturels : la luzerne, le pois.

Hôtes différentiels :

- Haricot :
  Lésions locales typiques.
  nécrose systémique des feuilles et de la tige,
  flétrissement rapide de la plante.

Autres hôtes : les mêmes que ceux du virus type mais beaucoup de plantes réagissent par des symptômes nécrotiques plus sévères.

YELLOW PARCH MOSAIC VIRUS (KREITLOW & PRICE, 1949)
Marmor medicaginis var. Ladino.

Hôte naturel : le trèfle blanc var. Ladino

Hôtes différentiels :

- Haricot : var. Abondance
  (2-3 jours) lésions locales rougeâtres (1-2 mm)
  pas d'infection systémique.
- Trèfle blanc :
  (12-21 jours): éclaircissement des nervures;
  mosaïque en plages jaune vif; déformations ;
  nanisme, quelquefois des nécroses.
- Vigna sinensis var. Black.
  éclaircissement local des nervures et nécroses
  brun-rouge.
- Tabacs :
  mosaïque jaune intense avec ilots vert foncé ;
  déformations; rabougrissement.
- Celosia argentea :
  lésions locales chlorotiques.

Autres hôtes : le pois (VC, M, Stu) le pois de senteur (Chl Sp, W), les trèfles (M, Stu) les melilots (M) le soja (Stu) Phaseolus lunatus (Chl, M); le petunia, le piment, le zinnia (Stu) Vinca rosea (Chl Sp).

Le virus ne semble pas infecter la luzerne, le concombre.

YELLOW DOT VIRUS (THOMAS, 1951)
Marmor medicaginis var. phaseoli

Hôtes naturels : le haricot, la luzerne

Hôtes différentiels :

-Haricot : var. Pinto, Blue Lake, Kentucky Wonder.
(4 jours) nécrose locale des nervures à la face inférieure des feuilles inoculées; lésions locales

.../...

à centre vert, marginées de brun foncé, en anneaux concentriques.
mosaïque diffuse systémique avec taches chlorotiques (1-2mm) coloration rouge des pétioles.
var. Contender, Top Crop :
mosaïque diffuse et petites taches jaunes systémiques.
var. Abondance, Michelite :
quelques taches jaunes diffuses.

- Féve :
  lésions locales nécrotiques.
  mosaïque systémique diffuse
- Vigna sinensis var. Black :
  petites lésions locales rouges.
  mosaïque systémique avec déformation et nanisme.
- Concombre :
  lésions locales chlorotiques circulaires (1-2mm).
  larges taches chlorotiques systémiques et déformations.

Autres hôtes : Le pois (m) les trèfles violet, blanc et incarnat (m) la luzerne, le soja (m); les tabacs (chl Sp.M) Gomphrena globosa (LL) le Zinnia (VC,m ou Lat).

MOSAIQUE JAUNE DE LA LUZERNE
ALFALFA YELLOW MOSAIC VIRUS = AYMV (ZAUMEYER Marmor medicaginis var.flavovarians 1953)

Hôte naturel : La luzerne

Hôtes différentiels

- Haricot : var.Abondance
  (4-5jours) lésions locales chlorotiques.
  marbrure systémique généralisée
  var. Pinto, Great Northern :
  (2-3 jours) lésions nécrotiques irrégulières (3-4 mm), brun rouge à centre clair, nécrose des nervures.
  mosaïque systémique avec enroulement et nécroses
- Pois : var. Perfected Wales
  très petites lésions locales nécrotiques
  streak sur tige
- Vigna sinensis var. Black
  lésions locales brun rouge
  mosaïque jaune déformante

.../...

Autres hôtes : la fève (LL,Str) les trèfles blanc et incarnat (m) Phaseolus lunatus (m), le melilot blanc (m) le soja (M); les tabacs (LL, MD) le datura (M,VB), le Zinnia(m)

Le virus ne semble pas infecter le trèfle violet, le concombre, le piment, le petunia, la tomate.

LOCAL LESION ALFALFA MOSAIC VIRUS (HOUSTON & OSWALD 1953)

Hôtes naturels : le trèfle blanc, la luzerne, la pomme de terre

Hôtes différentiels :

- Haricot : var. Abondance
  lésions locales (1-2mm) circulaires, marginées de noir; ou lésions irrégulières (4-5mm) brun-pourpre nécroses locales des nervures.
- Luzerne :
  anneaux chlorotiques concentriques.

SYSTEMIC ALFALFA MOSAIC VIRUS (HOUSTON & OSWALD, 1953)

Hôtes naturels : le trèfle blanc

Hôtes différentiels :

- Haricot : var. Abondance
  pas de réaction locale
  nécrose systémique sévère des nervures, des pétioles et des tiges.
- Luzerne :
  streak foliaire en plages chlorotiques jaunes.

Autres hôtes : Le trèfle blanc (Chl Sp, Stu), la fève (LL, M Str), les tabacs, la pomme de terre.

VEIN NECROSIS VIRUS = VNV (ZAUMEYER & PATINO, 1960)

Hôte naturel : le pois

Hôtes différentiels :

- Haricot var. Abondance, Kentucky Wonder, Top Crop, Michelite Robust :
  (2 jours) nécrose locale des nervures; plages chlorotiques et flétrissement de la feuille inoculée.
  mosaïque systémique ponctiforme avec nécrose des nervures, de la tige et nécrose apicale.
  Var. Pinto UI 111, Blue Lake, Red Mexican UI 34.
  (2 jours) nombreuses petites lésions locales (2mm) ou lésions plus rares et larges (5-8mm) brun rouge à bordure nécrotique; flétrissement.
  mosaïque et nécrose systémiques.

.../...

- Trèfle violet :
  mosaïque systémique sévère
- Vigna sinensis var. Black :
  lésions locales rougeatres (1-2mm) et nécrose des nervures,
  pas d'infection systémique
- Petunia :
  lésions locales jaunes, larges
  mosaïque systémique.

Autres hôtes : la fève (NLL, Str), Vicia villosa (LL) les trèfles hybride et incarnat (m), la luzerne (m), le melilot blanc (m) le lupin (LL) le soja (M); les tabacs (MD), le datura (m), Gomphrena globosa(LL).

Le virus ne semble pas infecter mécaniquement le pois, Phaseolus lunatus, le zinnia.

SOUCHE COLMAR (VUITTENEZ, 1961)

Hôte naturel : la luzerne.

Hôtes différentiels :

- Tabacs : mosaïque systémique très déformante
- Haricot : var. Saxa, Genfermarkt
  (3 jours) lésions locales à centre clair marginées de brun (1 mm) nécrose des nervures; flétrissement nécrotique .
  pas d'infection systémique.
- Vigna sinensis ; var. Black
  lésions locales rougeatres
- Concombre
  (11 jours) mosaïque systémique et rabougrissement.
- Chenopodes
  Chenopodium amaranticolor
  nombreuses lésions locales blanchâtres
  forte mosaïque systémique
  Chenopodium quinoa
  (4 jours) lésions locales chlorotiques diffuses
  mosaïque diffuse avec nanisme

Autres hôtes : les tabacs (M.D), le pétunia (MW), le datura (M,N) le piment (MD,N) Atropa belladona (Chl, M, NV,Stu) la pomme de terre (N,Stu).

La virus ne se transmet pas mécaniquement à la fève, au pois, à la luzerne, aux trèfles violet et incarnat, à la vesce cultivée; à la tomate.

.../...

YELLOW SPOT MOSAIC VIRUS = YSMV (ZAUMEYER, 1962)

Hôtes naturels : la luzerne, le haricot ?

Hôtes différentiels

- Haricot : var. Abondance
  pas de lésion locale.
  larges taches jaunes systémiques, déformation des gousses.
  var, Pinto UI 111,
  petites lésions locales nécrotiques (0,5 mm)
  marbrure systémique, "yellow stipple"
  Var. Top Crop
  lésions locales nécrotiques
  taches jaunes systémiques (5 mm) et mosaïque brillante ("calico").
- Trèfle blanc (Ladino)
  mosaïque systémique.
- Tabacs :
  lésions nécrotiques systémiques blanchâtres et mosaïque du type "calico".
- Datura :
  taches jaunes petites et nombreuses.

Autres hôtes : le pois (N,Str) la fève (LL, Stm), le melilot blanc, Phaseolus lunatus, Vigna sinensis (LL) le trèfle hybride, le trèfle incarnat (Lat) le Soja, le pétunia.

Le virus ne semble pas infecter le trèfle violet, le concombre.

IDAHO ALFALFA MOSAIC VIRUS = IAMV (ZAUMEYER, 1963)

Hôtes naturels: la luzerne, le haricot ?

Hôtes différentiels :

- Haricot : var. Abondance
  pas de lésion locale
  mosaïque diffuse et taches jaunes systémiques
  var. Pinto UI 111
  (2 jours) lésions locales nécrotiques (1-3 mm) circulaires brun rouge.
  nécrose systémique des pétioles et de la tige; coloration rouge des noeuds, mosaïque et rabougrissement; déformation des gousses.
- Trèfle violet :
  éclaircissement des nervures et mosaïque

Autres hôtes : les mêmes hôtes que ceux du YSMV sauf le datura et le trèfle blanc.

Le virus n'infecte pas ces deux dernières espèces, ainsi que le concombre.

.../...

STAIN 425 (HAGEDORN & HANSON, 1963)

Hôte naturel : le trèfle violet

Hôtes différentiels :

- Trèfle violet :
  (4 semaines) déformations foliaires, mosaïque et rabougrissement.
- Melilot blanc :
  rabougrissement, chlorose diffuse des nervures, nécrose apicale.
- Pois var. Horal, Wisconsin Perfection, Pride, Alaska
  nécroses en lignes à la face inférieure des feuilles.
  streak sur tige.

Autres hôtes : le haricot (LL) le trèfle hybride (VB,NSp) le trèfle incarnat, la fève (RSp, LL), la pomme de terre (LL,N) le concombre (M,Stu); les tabacs, le zinnia (RSp).

PEA-STRAIN (PATINO & ZAUMEYER, 1959)

Hôte naturel : le pois

Hôtes différentiels :

- Haricot : var. Pinto, Great Northern, Kentucky Wonder, Michelite, Top Crop.
  (2 jours) lésions locales brun rouge (3mm) en anneaux; nécrose des nervures et flétrissement.
  taches chlorotiques systémiques; nécrose des nervures; déformations; "streak" sur tige; rabougrissement. Anneaux bruns sur gousses.
- Pois :
  "Streak" sur tige.
- Fève :
  lésions locales brunes en anneaux.
  nécrose systémique.
- Tabacs : Nicotiana glutinosa :
  taches chlorotiques, mosaïque déformante
  ponctuations nécrotiques.

Autres hôtes : le soja (M,D) les lupins (LL,W) le trèfle hybride (VB,NSp) la vesce cultivée et Vicia cillosa (LL,Str) Vigna sinensis (LL,M) les tabacs (ChlSp, N) le datura (M), le piment, le petunia (NLL,M) le zinnia (Lat).

Le virus ne semble pas infecter la luzerne, le melilot blanc, les trèfles violet et incarnat; la lentille, le concombre.

VIRUS DES TREFLES

MOSAIQUE DES NERVURES DU TREFLE VIOLET
RED CLOVER VEIN MOSAIC = RCVMV (OSBORN, 1937)
Pea stunt (HAGEDORN & WALKER, 1949)

Hôtes naturels : le pois, les trèfles, les melilots.

Hôtes différentiels :

- par inoculation mécanique

- Trèfle violet :
  (1 mois), éclaircissement des nervures, mosaïque légère; feuilles gaufrées, rabougrissement. inclusions cristallines intracellulaires.
- Pois
  var. Perfected Wales, Horal, Perfection, New Era: éclaircissement des nervures, rabougrissement; croissance terminale en rosette.
- Gomphrena globosa :
  (3 jours) lésions locales rouges.
- Les fèves et les trèfles violets issus de graine infectée.

Autres hôtes : le pois de senteur (D,TN) les melilots (VC,M,ChlSp) le trèfle blanc (m), les trèfles hybride (VC,N) et incarnat (VC,Stu) la fève (VC,Stu,W) la luzerne lupuline.

Le virus ne semble pas infecter le haricot, la luzerne (?) le soja, Vigna sinensis.

SOUCHE DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DES NERVURES DU TREFLE VIOLET

ERBSENSTAUCHE VIRUS = EKV (QUANTZ, 1958)

Hôte naturel : le pois

Hôtes différentiels

- Vicia narbonensis :
  lésions locales brunes.
  nécrose systémique par taches; nécrose des nervures et flétrissement apical.
- Pois chiche :
  nécrose systémique et flétrissement.

Autres hôtes : la fève (Lat) le pois de senteur (Chl, W ou Lat), les trèfles (VC ou Lat) la luzerne lupuline (m) Ipomoea purpurea (Stu, D).

Le virus ne semble pas infecter le haricot, la luzerne, Vigna sinensis.

.../...

MOSAIQUE DU TRÈFLE BLANC
WHITE CLOVER MOSAIC VIRUS = WCMV (ZAUMEYER & WADE 1935)
Pea wilt (JOHNSON, 1942).

Hôtes naturels : le trèfle blanc, le trèfle violet, le pois.

Hôtes différentiels :

- Pois :
  (6 jours) flétrissement des feuilles inoculées
  éclaircissement des nervures, mosaïque en potites taches chlorotiques.
  coloration brune de la tige et rabougrissement, flétrissement apical.
- Haricot : var. Beka, Abondance
  (6 jours) taches chlorotiques locales, étoilées, diffuses, et nécrose brune des nervures et des pétioles.
  éclaircissement des nervures, déformations, mosaïque jaune.
- Vigna sinensis
  (6 jours) lésions locales brun rouge, petites ou anneaux chlorotiques. mosaïque systémique irrégulière.
- Fève :
  lésions locales nécrotiques, mosaïque systémique
- Concombre :
  (5 jours) taches chlorotiques locales
  taches systémiques diffuses.

Autres hôtes : les trèfles blanc et incarnat (m) le trèfle violet(MD)

Le virus ne semble pas infecter des plantes en dehors de la famille des légumineuses (sauf le concombre); il ne donne pas de lésions locales sur Gomphrena globosa et sur Chenopodium amaranticolor.

SOUCHES :

Les souches hollandaises WKV, ER, TRV et DEL isolées de trèfle blanc, de trèfle violet et de pois, ont des gammes d'hôtes identiques; elles peuvent se différencier par la gravité des symptômes obtenus.

MOSAIQUE JAUNE DU TREFLE.
CLOVER YELLOW MOSAIC VIRUS = CYMV
Pea mottle (JOHNSON, 1942)

Hôtes naturels : les trèfles

Hôtes différentiels :

- Pois
  (6-12 jours) éclaircissement des nervures, mosaïque systémique avec rabougrissement; pas de flétrissement
- Concombre
  (7-10 jours) taches chlorotiques locales, pas d'infection systémique
- Chenopodes
  Chenopodium amaranticolor
  nombreuses petites lésions locales nécrotiques, taches chlorotiques systémiques diffuses
- Gomphrena globosa :
  lésions locales rougeâtres.
- Muflier :
  (2 semaines) lésions locales en anneaux mosaïque déformante systémique avec streak.

Autres hôtes : le haricot (11,M) les trèfles (ChlSp,M,Stu), la fève (NSp,M ou Lat), Vigna sinensis (m)

RED CLOVER MOTTLE (SINHA, 1960)

Hôte naturel : le trèfle violet

Hôtes différentiels :

- Haricot : var. Prince
  (3-4 jours) lésions locales necrotiques avec halo chlorotique
  taches chlerotiques systémiques diffuses
- Fève :
  (6-10 jours) lésions locales brunes
  forte mosaïque systémique avec streak
- Soja :
  (10-12 jours) taches chlerotiques; marbrure systémique diffuse, chlorose.
- Vigna sinensis :
  lésions locales rougeâtres.
- Gomphrena globosa :
  lésions locales nécrotiques, nécrose des nervures.

Autres hôtes : le trèfle violet (VC,M ChlSp) les trèfles blanc et incarnat (VC, Chl) le melilot blanc (VC), le pois (VC,VB,M,Stu);
Le virus ne semble pas infecter les tabacs, le datura, le concombre, Chenopodium amaranticolor.

PHYLLODIE DU TREFLE (FRAZIER & POSNETTE, 1957)
Virus des pétales verts du fraisier.

Hôtes naturels : les trèfles violet, blanc et hybride

Hôtes différentiels :

Le virus n'est pas inoculable mécaniquement. On peut le transmettre par greffe et par cicadelles vectrices.

- Trèfle blanc : rabougrissement de la plante; feuilles chlorotiques, bordées de rouge, déformation des pièces florales; virescence et phyllodie.

Autres hôtes : les trèfles violet et hybride, le fraisier, Callistephus chinenis (chl), Anthemis cotula (Chl, phyllodie) Erodium cicutarium, Anagallis arvensis (Chl, W) Helenium.

AUTRES VIRUS

SOUCHE DE LA NECROSE DU TABAC

STIPPLE STREAK (HUBBELING, 1949 ; VANDERWANT 1948)
Marmor lethale

Hôtes naturels : le haricot, les tabacs, la tulipe

Hôte différentiel :
Haricot : la plupart des variétés :
lésions locales brunes; nécrose des nervures,
déssèchement rapide des feuilles inoculées.
nécrose systémique apicale.

Autres hôtes : De très nombreuses espèces communes pour le virus type de la nécrose du tabac.

SOUCHE DU STREAK DU TABAC

RED NODE VIRUS (THOMAS & ZAUMEYER 1950)
Annulus orae var. phaseoli

Hôtes naturels : le haricot et probablement beaucoup d'espèces de légumineuses et de solanées.

Hôtes différentiels :
Haricot var. Pinto 78, Kentucky Wonder :
lésions locales brun rouge, larges, circulaires.
nécrose de la tige ; coloration rouge des noeuds ;
nécroses systémiques sur feuilles ; rabougrissement
taches déprimées sur gousses avec dessins rougeâtres
concentriques ; gousses fortement déformées.

Tabac :
quelques lésions locales nécrotiques blanchâtres en cercles concentriques ; nécroses systémiques en arcs de cercle et stries parallèles le long des nervures; dessin en feuille de chêne ; rabougrissement et déformation des feuilles.

Autres hôtes :
le pois,(Str)la fève, Vigna, (N); le mélilot, les trèfles violet et incarnat (M) les tabacs, le datura(M) le concombre (LL,M)

Le virus ne semble pas infecter le trèfle blanc et la luzerne.
Contrairement à la souche type du streak il n'infecte pas le Nicotiana glutinosa.
Un virus analogue isolé en France à partir de pois, provoque cependant sur ce Nicotiana une forte mosaïque déformante.

SOUCHE DU RING SPOT DU TABAC

SOUCHE HARICOT (CHEO & ZAUMEYER, 1952)

Hôte naturel : le haricot

Hôtes différentiels :

Haricot var. Idaho Refugee, Stringless Green Refugee, Michigan Dark Red Kidney.

taches locales chlorotiques ou nécrotiques, anneaux concentriques, nécrose des nervures, flétrissement des feuilles inoculées.
taches nécrotiques systémiques et nécrose apicale.

Phaseolus lathyroïdes :
lésions locales chlorotiques, éclaircissement des nervures et marbrure systémique.

Dolichos lablab :
petites lésions locales nécrotiques, Streak systémique.

Nicotiana sylvestris :
lésions locales en lignes blanchâtres irrégulières, taches nécrotiques systémiques en anneaux suivies de recovery.

Autres hôtes : le soja (LL, NV, M) le lupin blanc (NSp, NSp TN) Vigna sinensis var. Victor (NV,TN), le datura (LL, chl, NSp), le petunia (NLL, VC) le concombre Chl LL,M) le trèfle violet (Lat).
Le virus ne semble pas infecter le melilot blanc.

SOUCHES DE LA MOSAIQUE DU CONCOMBRE

SOUCHE 14 = CMV 14 (WHIPPLE & WALKER, 41)

Hôtes naturels : le pois et le haricot

Hôte différentiel :

Datura : mosaïque systémique.
La gamme d'hôtes du virus est très voisine de celle du CMV type. Parmi les légumineuses, le virus infecte le haricot le pois et le soja.
Le virus ne semble pas infecter la fève.

SOUCHE DU POIS (HAGEDORN, 1950)

Hôte naturel : le pois

Hôtes différentiels :

Pois : mosaïque systémique avec streak sur tige ; très fort rabougrissement, flétrissement apical.

Concombre : mosaïque caractéristique du virus type.

Autres hôtes : le haricot, la fève, la plupart des trèfles, le melilot jaune, le soja, Vigna sinensis (LL M) les tabacs, le zinnia.

SOUCHE DE LA LUZERNE (DOOLITTLE & ZAUMEYER, 1953)

Hôte naturel : la luzerne

Hôtes différentiels :

Haricot : var. Pinto, Michelite
très net éclaircissement local des nervures
mosaïque systémique
var. Abondance, Great Northern 123 :
mosaïque systémique

Pois : var. Perfection, Perfected Wales.
flétrissement des feuilles inoculées
mosaïque systémique et streak

Datura : lésions locales en ringspot.

Epinard : var. Old Dominion
mosaïque systémique, nécrose apicale

Autres hôtes : la fève (LL,M,TN), le pois de senteur (M,TN) les melilots (M,RSp) le trèfle incarnat (M), Vigna sinensis et V. Sesquipedalis (LL,M); le concombre (LL,M) les tabacs (LL,m), le pétunia, le zinnia, le celeri, Gomphrena globosa (LL).
Le virus ne semble pas infecter mécaniquement la luzerne, les trèfles violet et blanc, le piment.

MALADIE BRONZEE DE LA TOMATE
TOMATO SPOTTED-WILT (WHIPPLE, 1936)

Hôtes naturels : le pois et beaucoup de solanées.

Hôtes différentiels :

Fève : lésions locales nécrotiques zonées et flétrissement des feuilles inoculées.
Streak sur tige; nécrose apicale.

Vigna sinensis :
lésions locales rouges zonées peu distinctes.

Pétunia :
lésions locales circulaires à centre clair, marginées de brun rouge (3 jours)

Nicotiana glutinosa :
lésions locales (4 jours) qui s'élargissent en cercles concentriques de 2-3 mm.
suivies souvent d'une nécrose systémique léthale.

Autres hôtes : Un grand nombre d'espèces : des solanées, des composées et des légumineuses.

Le virus ne semble pas infecter le haricot, le concombre.

SOUCHE DE LA MOSAIQUE DE LA BETTERAVE

SOUCHE POIS (QUANTZ, 1958)
Marmor betae.

Hôte naturel : le pois

Hôtes différentiels :

Pois : nécroses brunes sur feuilles ; nécrose des nervures; frisolée; streak sur tige et pétioles; flétrissement apicale.
coloration gris brun des cosses.

Tetragonia expansa :
taches chlorotiques locales (5mm) à centre nécrotique; flétrissement, chlorose systémique diffuse.

Chenopodes :
Ch. amaranticolor et Ch. quinoa
lésions locales nécrotiques blanches, nombreuses, chlorose systémique; déformation des feuilles.
dans quelques cas, nécrose généralisée.

Autres hôtes : Vicia narbonensis, la betterave, l'épinard, Stellaria media.

LEGENDE DES PLANCHES

PLANCHE I -

Réactions locales sur légumineuses

A - Lésions locales nécrotiques annulaires sur feuilles cotylédonaire de haricot var. Pinto, inoculée avec le southern bean mosaïc virus (SBMV).

B - Lésions locales punctiformes, du type virus mosaïque de la luzerne, sur feuilles cotyledonaires de haricot var. Top Crop inoculées avec un extrait de haricot mosaïqué.

C - Nécrose généralisée des nervures avec flétrissement sur feuilles cotylédonaire de haricot var. Triomphe de Farcy, inoculée avec un extrait de trèfle blanc mosaïqué.

D - Eclaircissement local des nervures sur feuille cotylédonaire de haricot var. Top Crop inoculée avec un extrait de trèfle blanc mosaïqué.

E - Taches chlorotiques diffuses sur feuille cotylédonaire de Vigna sinensis var. Blank, inoculée avec un extrait de haricot mosaïqué.

F - Taches nécrotiques punctiformes sur feuille cotylédonaire de Vigna sinensis var. Black inoculée avec un extrait de fève mosaïqué.

G.H. - Taches nécrotiques zonées, de type ringspot, avec halo chlorotique, sur feuilles de fève inoculées avec un extrait de trèfle blanc mosaïqué.

PLANCHE II

Réactions des chenopodes

A - Taches chlorotiques locales diffuses au voisinage des nervures sur feuilles de Chenopodium quinoa inoculées avec [illegible] de la mosaïque commune du pois (PCMV).

B,C. - Réaction systémique sur Chenopodium amaranticolor, inoculé avec le virus de la mosaïque commune du pois (PCMV) : taches chlorotiques avec éclaircissement local des nervures déformations ; nanisme.

D - Relations locale et systémique sur Chenopodium quinoa inoculé avec un extrait de trèfle blanc mosaïqué : lésions locales chlorotiques et nécrotiques ; lésions systémiques nanisme et déformations foliaires.

E - Réactions locale et systémique sur Chenopodium quinoa inoculé avec une souche du virus de la mosaïque de la luzerne lésions locales chlorotiques, taches diffuses systémiques.

F - Réaction systémique sur Chenopodium amaranticolor inoculé avec une souche du virus de la mosaïque de la luzerne ; taches chlorotiques diffuses et déformation des feuilles.

PLANCHE III

Réactions systémiques sur légumineuses

A - Très forte mosaïque jaune en taches parallèles aux nervures et frisolée des jeunes feuilles, sur Melilotus indicus inoculé avec le virus de la mosaïque commune du pois (PCMV)

B - Très forte mosaïque avec îlots vert foncé, éclaircissement généralisé des nervures ; déformations et nanisme des jeunes feuilles sur Trifolium incarnatum inoculé avec le virus de la mosaïque commune du pois (PCMV)

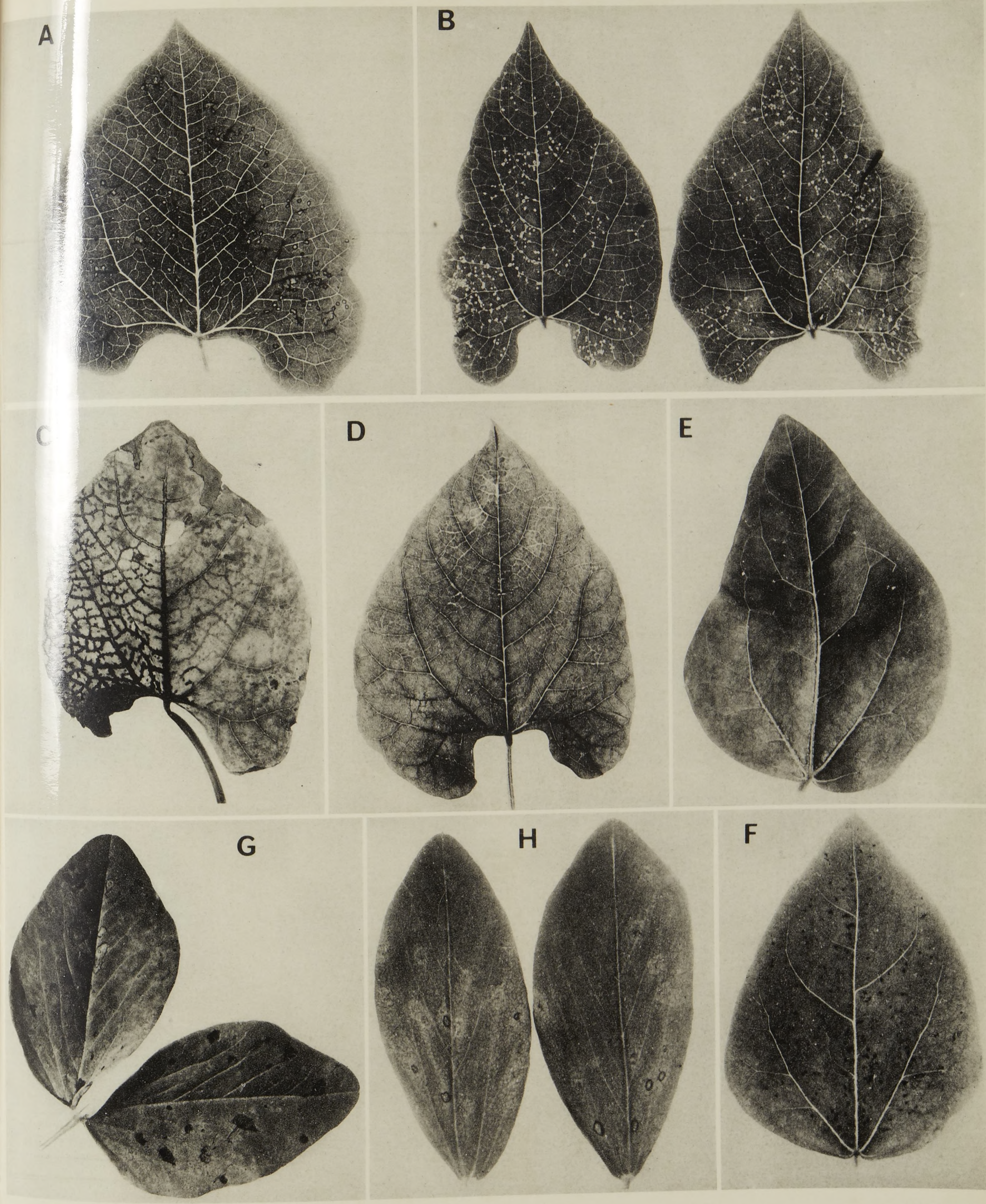
C - Eclaircissement généralisé des nervures, mosaïque et déformation des jeunes feuilles avec tendance au filiformisme sur Trigonella foenum-graecum inoculé avec le virus de la mosaïque commune du pois (PCMV)

D - Eclaircissement des nervures, taches chlorotiques et mosaïque déformante sur Anthyllis vulneraria inoculé avec un extrait de trèfle blanc mosaïqué.

Réactions systémiques sur solanées

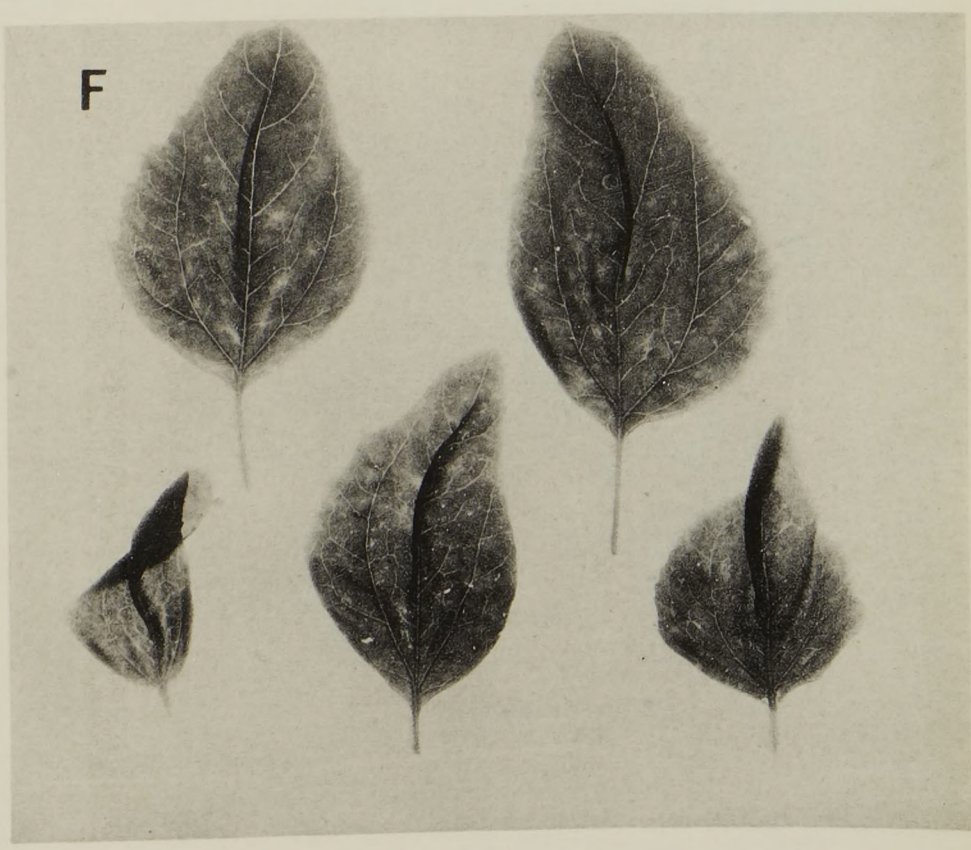
E - Taches nécrotiques et lignes parallèles aux nervures sur les premières feuilles de Nicotinia tabacum var. Samsum, infectées par le virus de la mosaïque de la luzerne (LMV). L'infection se poursuit par une forte mosaïque nécrotique.

F - Mosaïque systémique déformante sur Nicotinia glutinosa inoculé avec un extrait de pois atteints d'une mosaïque nécrotique. (virus du type "streak").



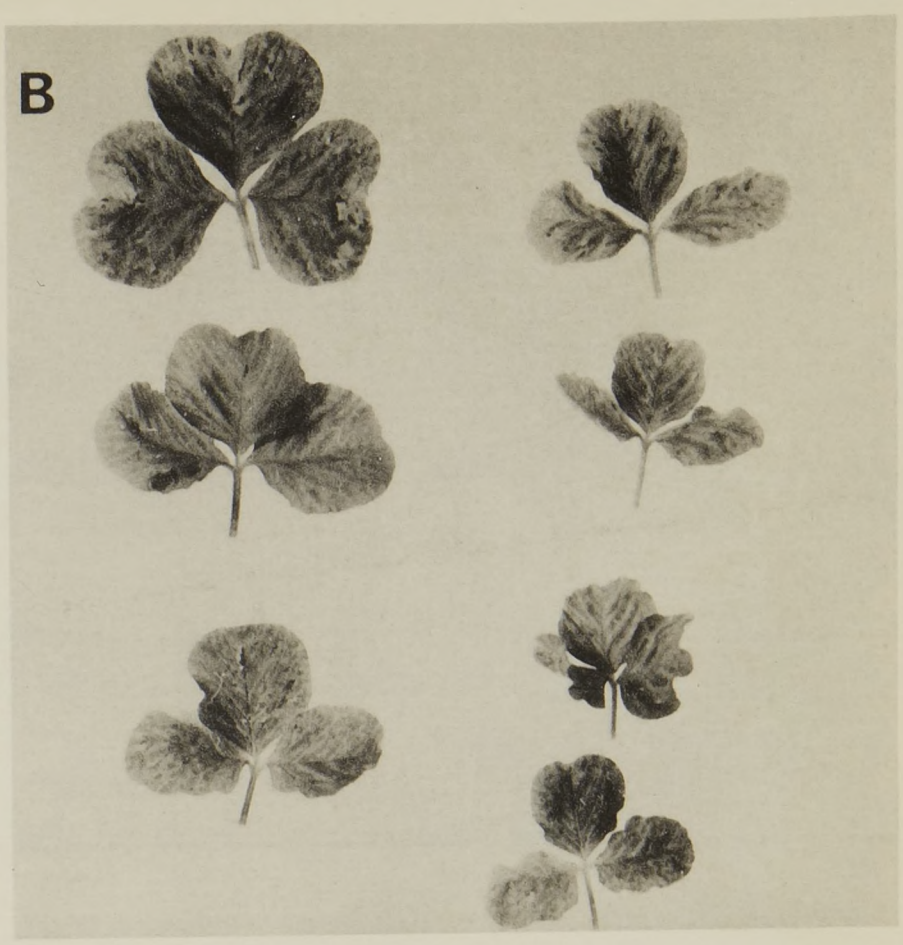
ÉTUDES DE VIROLOGIE APPLIQUÉE
J.-C. Devergne

N° 5 - 1964
Planche I



ÉTUDES DE VIROLOGIE APPLIQUÉE
J.-C. Devergne

N° 5 - 1964
Planche II



ÉTUDES DE VIROLOGIE APPLIQUÉE
J.-C. Devergne

N° 5 - 1964
Planche III

LA REPLICATION DES VIRUS A ACIDE RIBONUCLEIQUE

(Revue générale sommaire)

P. CORNUET et S. ASTIER-MANIFACIER.

Le cycle des virus dans la cellule peut se schématiser par la succession d'un certain nombre de stades dont les définitions sont à la mesure de l'imprécision de nos connaissances actuelles c'est-à-dire, qu'elles ne représentent que très grossièrement l'enchaînement continu des réactions physico chimiques qui aboutissent à l'envahissement de la cellule par d'innombrables particules virales.

L'adsorption sur la cellule, la pénétration du pouvoir infectieux dans lecytoplasme, le replication de l'acide ribonucléique (ARN) du virus, la synthèse de la protéine virale, enfin la recombinaison de ces deux éléments ou maturation pour former les nouvelles particules infectieuses sont des étapes qui ont été repérées en premier lieu chez les bactériophages et que l'on a pu depuis appliquer à la majorité des infections virales chez les animaux ou les végétaux.

I- Adsorption et éclipse du virus.

Après avoir déposé un abrasif sur une feuille de Tabac et appliqué par légers frottements une suspension virale, on réalise l'inoculation. Si à cet instant même, la surface du limbe est lavée à grande eau, le taux d'infection n'est pas réduit. L'adsorption du virus à la surface de la cellule lésée, est un phénomène de nature physique presque immédiat. Ce mécanisme est influencé et concurrencé par de nombreux facteurs internes ou externes qui peuvent encore décider de la réussite ou de l'échec de l'infection.

A la suite de cette adsorption, intervient ce que l'on appelle la phase obscure, ou l'éclipse du virus, ainsi nommée parce que le pouvoir infectieux semble disparaître pendant un certain temps. Si l'on broie après 30 minutes une feuille copieusement inoculée, il est impossible d'utiliser cette suspension comme source de virus pour une nouvelle inoculation, par contre ce même essai effectué seulement 1 ou 2 minutes après l'inoculation est encore positif.

De nombreuses observations indirectes ont amené à concevoir, que cette éclipse est dûe à la séparation entre la protéine du virus et son acide nucléique, mécanisme qui occasionne, non la perte temporaire du pouvoir infectieux, mais seulement une apparence de perte dûe à la variation de sensibilité entre virus complet et acide nucléique infectieux.

.../...

Pour le "foot and mouth diseases" par exemple tout le pouvoir infectieux libre après inoculation et broyage des cellules est sensible à la ribonucléase alors que le virus complet ne l'est pas. (CASTWRIGHT, STEWART 1961). Avec un virus doublement marqué 35 S dans la protéine 32 P dans l'acide nucléique on peut facilement constater que les 2 isotopes se séparent peu après l'inoculation, 80% du 32 P n'étant plus sédimentable à 100.000 g. (HOYLE FINTER 1957).

Par spectrophotométrie en infra rouge on détermine au moment de l'inoculation de Tabacs avec la Mosaïque du Tabac des variations d'absorption qui permettent de supposer que les sous unités protéiques du bâtonnet se désagrègent, libérant ainsi l'ARN (COCHRAM, WELKIC). De même que l'adsorption, la séparation Protéine-ARN semble pour la majorité des auteurs être un phénomène passif pour l'hôte. Des cellules He La tuées à 56°C sont encore capables de subir le déroulement de cette phase (HOLLAND Mc LAREN 1959), mais cela n'exclue pas la présence d'un enzyme dont l'activité permettrait la libération de l'acide nucléique infectieux. Quoi qu'il en soit, l'on sait bien aujourd'hui que l'ARN est infectieux à lui seul et que son intégrité est une condition nécessaire et suffisante à l'établissement de l'infection.

II - Allure générale de la synthèse.

Un instant le virus a semblé disparaitre et quelques minutes après le voilà innombrable, ayant tout drainé pour sa synthèse, occupant une cellule épuisée. 6.10^7 particules dans une cellule; 80% des protéines de la plante transformées en protéine virus. Comment un tel bilan a-t-il pu s'établir ?

Une des premières constatations qui ait été faite dans le mécanisme de la replication virale est la séparation dans le temps entre la synthèse de l'ARN et celle de la protéine du virus; la succession du phénomène est en fait très rapide et selon les virus présente un chevauchement plus ou moins important. Bien que l'interprétation soit limitée par la sensibilité des méthodes de dosage des acides nucléiques et des protéines, il est certain aujourd'hui que le premier élément constitutif du virus qui apparait dans la cellule est son acide nucléique présent semble-t-il dans son intégrité.

Pour l'Encéphalomyocardite (BELLET et BURNES, 1960), l'ARN est détecté dans le noyau de la cellule 30 minutes après l'infection, l'hémoglutine n'apparaît que quatre heures après dans les mitochondries. Dans l'infection à Poliomyelite, le décalage est de l'ordre de 15 minutes et la majeure partie des deux synthèses se fait parallèlement (DARNELL 1961). Avec la Mosaïque du Tabac on ne trouve de l'ARN libre que chez les feuilles récemment inoculées (CORNUET et SPIRE) et la ségrégation des synthèses ARN et protéine a été mise en évidence à l'aide de la différence de sensibilité à la ribonucléase des deux constituants.

.../...

La divergence des localisations des deux synthèses parait évidente dans le cas de l'Encephalomyocardite citée plus haut, elle semble établie aussi pour le TMV (ZECH), le spectrophotomètre révélant une absorption principalement nucléaire au début de l'infection de la cellule, qui diffuse ensuite vers le cytoplasme où doit avoir lieu la synthèse protéique. La possibilité de suivre les manifestations de la synthèse d'ARN viral sur noyaux isolés pour le TMV (CORNUET et ASTIER, 1962) et pour l'Encephalomyocardite (ZALTA et coll. 1963), confirment ce point de vue.

Par contre l'autoradiographie de cellules infectées par le Mengo virus montre un blocage de la synthèse des ARN normaux dans le noyau, l'incorporation de nucléotides est presque uniquement localisée au cytoplasme, elle correspond à la synthèse de l'ARN viral (FRANKLIN ROSNER 1962). S'agit-il de différences dûes au virus étudié ou bien cette contradiction n'est-elle qu'apparente, l'ARN viral effectuant sa replication à des niveaux cellulaires différents selon le stade d'évolution de la cellule ? La question pour le moment reste posée.

On constate donc qu'il y a décalage entre la synthèse de l'ARN et de la Protéine, mais en approfondissant, on peut remarquer que les phénomènes ne sont pas seulement coordonnés dans le temps mais encore fonctionnellement reliés l'un à l'autre, en ce sens que les agents qui inhibent l'ARN empêche aussi la formation de la protéine.

Inversement, (WECKER, HUMMLER, GOETZ 1962) certains inhibiteurs protéiques, tel que la Puromycine n'ont pas d'action directe sur l'ARN. Le sens est donc unique et obligatoire : synthèse de l'acide nucléique qui induit la formation de sa protéine spécifique, enfin maturation du virus par union des deux constituants.

III - La synthèse de l'ARN viral.

Au contact de l'ADN de la chromatine, la cellule normale forme inlassablement au cours de sa vie les acides nucléiques normaux de séquence nucléotidique complémentaires de l'ADN. Les ARN messagers transfèrent l'information des chromosomes sur les lieux de synthèse protéique que sont les ribosomes du cytoplasme, ainsi la majorité des ARN normaux sinon tous, sont transcrits à partir de l'ADN par un enzyme l'ADN-ARN polymérase. On pourrait imaginer sur ce schéma que l'infection amènerait une transformation de l'ADN de la cellule, la partie modifiée servant de modèle (" primer ") à la synthèse de l'ARN viral.

Il faut tout de suite éliminer cette hypothèse; l'ADN de la cellule n'entre pas en jeu dans la synthèse de l'ARN viral. Les preuves sont nombreuses :

.../...

aucune augmentation de "turn over" de l'ADN (SIMON 1961), pas de complémentarité ADN, ARN viral (ASTIER et CORNUET, 1964) mais surtout l'action de l'Actinomycine D apporte la démonstration la plus convaincante.

L'Actinomycine D est un antibiotique puissant contre les bactéries gram +, un agent antitumoral et antimutagène; il supprime totalement la synthèse des acides ribonucléiques normaux dans les cellules. L'actinomycine D a une affinité particulière avec les groupements guanines et se fixe spécifiquement sur l'ADN; ce dernier ne peut plus servir de modèle, l'ADN-ARN polymérase démunie de modèle pour faire la transcription, cesse son activité, aucun acide ribonucléique normal n'est donc produit. Or, dans toute cellule infectée traitée à l'actinomycine D, il est tout à fait remarquable de constater que la synthèse du virus et plus particulièrement de son acide ribonucléique n'est absolument pas affectée.

La replication de l'ARN viral ne semble donc pas réalisée par l'ADN-ARN polymérase et l'ADN de l'hôte est étranger au mécanisme de la replication. Remarquons par ailleurs qu'il existe maintenant un système qui permet in vivo d'étudier la synthèse de l'ARN viral sans risques d'interférence avec l'ARN normal.

Le problème que nous devons nous poser maintenant est de savoir quel système enzymatique synthètise l'ARN viral puisqu'il ne dépend pas du principal système normal.

Deux hypothèses peuvent être envisagées : ou bien la polymérase préexiste avant l'infection et constitue un système normal de la cellule ou bien elle apparait et dans ce cas elle est induite par les premières châines d'ARN viral pénétrant dans la cellule. Un autre inhibiteur bactérien, le parafluorophenyl alanine (FPA) apporte une réponse à cette question. Le FPA est un acide aminé analogue et il est connu pour inhiber la synthèse protéique et par conséquent la synthèse des systèmes enzymatiques. Si l'on ajoute le FPA au moment de l'infection, aucune synthèse d'ARN viral ne se produit; si on l'ajoute après que la synthèse de l'ARN viral ait débuté, le FPA occasionne l'arrêt complet avec un délai de 3/4 d'heures après son administration. On en déduit que la synthèse de l'ARN viral dépend elle même de la synthèse continue d'une protéine spécifique.

Cette protéine doit être l'enzyme responsable, sa vie active in vivo étant de l'ordre de 3/4 d'heure.

Si maintenant, on combine l'action de l'Actinomycine D et de la FPA, on constate que l'enzyme est bien produite en présence d'Actinomycine D, ce qui implique que sa synthèse est dirigée par le génome du virus et non par le génome de l'hôte. L'ARN viral porte l'information nécessaire à la synthèse d'un système enzymatique qui effectue sa propre replication (autoreplication).

.../...

Par la voie indirecte des inhibiteurs, on a donc de fortes présomptions concernant l'existence d'un système enzymatique spécifique; c'est vers l'isolement et la détermination des conditions de fonctionnement d'un tel système qui concourent de nombreuses recherches à l'heure actuelle.

IV - Isolement de la polymérase virale.

On comprend que la recherche d'un système dont la durée de vie est de 45 mn, parmi plusieurs milliers de systèmes enzymatiques normaux, pose des problèmes complexes. Les quelques résultats bruts qui suivent ne pourront être interprétés avec certitude que dans les années à venir.

- Virus de la Mosaïque du Tabac - (CORNUET et ASTIER-MANIFACIER 1962).

On peut isoler un système enzymatique actif à partir de la fraction nucléaire d'un broyat de feuilles infectées. Par précipitation au sulfate de Protamine, on obtient une fraction proteique dont l'activité polymérisante a été testée par deux méthodes :

1° - Test du pouvoir infectieux.

Le système enzymatique est incubé en présence :

- de MT-RNA extrait par la méthode au phénol;
- des quatre nucleotides triphosphates;
- d'un tampon Tris pH 9,5 contenant 10^{-3}M. Mg

Résultats : (moyenne de 6 essais) :

	Temps 0 mn.	Temps 60 mn.
Milieu complet (4 nucléotides)	100 lésions	156 lésions
Milieu incomplet (3 nucléotides)	100 lésions	66 lésions

Synthèse nette : 236% du témoin incomplet.

2° - Incorporation de nucléotides ^{14}C dans l' ARN.

Un des nucléotides (généralement (ATP) est radio actif. L'ARN radioactif formé représenté par la fraction acide insoluble est compté :

.../....

	Temps 10 mn, 37°.
Milieu complet (4 nucléotides)	90 c/m soit : 1,8mμ M.ATP/mg Proteine
Milieu incomplet (3 nucléotides)	70 c/m soit : 1,4mμ M.ATP/mg Proteine.

Pour ce même virus d'autres auteurs (YOUNG TAI KIM et WILDMAN, 1962, COCHRAN, 1962, KARASEK et SCHRAMM, 1963), utilisant des méthodes fort variables, ont aussi isolé une activité enzymatique synthètisante et concluent à la possibilité de biosynthèse in vitro du pouvoir infectieux du virus de la Mosaïque du Tabac.

- Virus de l'Encephalomyocardite :(CLINE, 1962).

Des cellules He-La infectées par ce virus sont homogénéisées et détruites par action des Ultra sons. Le surnageant d'une centrifugation de 15 mn à 10.000 g, montre une incorporation d' U.T.P. ^{32}P plus élevée que le témoin non infecté en présence des 4 nucléotides triphosphates à pH 9,5.

- Mengovirus et Virus de la Poliomyélite. (BALTIMORE et FRANKLIN (1962, 1963).

Ces cellules He-La infectées sont homogénéisées et les débris cellulaires éliminés. Le culot d'une centrifugation de 90 mn à 78.000 g, contient la polymérase.

Pour le Mengovirus : en mμ M.ATP., incorporé par mg proteine.

En présence des 4 Nucléotides triphosphates 0,12 mμ M.ATP

" 2 " " 0,05 mμ M.

Cette incorporation n'est pas affectée par l'Actinomycine D ni par la DNAse.

- Bacteriophage MS2 (HARUNA et coll., SPIEGELMAN, 1963).

Des bactéries infectées par le bactériophage sont brisées par congélation, puis soumises à l'action de la DNAse. Le surnageant d'une centrifugation de 20 mn à 15.000 g est fractionné par précipitation au sulfate de Protamine et au sulfate d'Ammonium (la fraction active est précipitée entre 30 et 50% de saturation).

.../...

En présence des 4 Nucléotides triphosphates 4,7mμM.ATP incorporé/mg proteine
3 " " 0,02 " " " "

On doit faire deux hypothèses sur le mode d'action possible de ces polymérases on peut envisager une copie de la chaîne modèle, nucléotide à nucléotide; mais il est possible aussi qu'il y ait d'abord synthèse d'une chaîne de séquence complémentaire.

Pour le moment cette deuxième hypothèse ne s'appuie que sur l'existence de RNA en double hélice, mis en évidence pour le virus de l'Encephalomyocardite et pour le bacteriophage MS2 = mais rien ne permet cependant d'affirmer qu'il s'agit là effectivement d'une forme transitoire de replication de l'ARN.

Avec des préparations purifiées de la polymérase de l'ARN du bacteriophage MS2, HARUNA a pu prouver que, si l'on essaye plusieurs modèles de RNA, l'enzyme montre une nette préférence pour le RNA qui l'a induite.

Modèle	Triphosphates incorporés en mμ/Mmg proteine.
MS2 - RNA	8,5
S-RNA E. coli	0,09
RNA ribos. E. coli.	0,06
TMV-RNA	0,3
TYMV-RNA	2,2
0	0,08

La polymérase est donc spécifique de l'ARN viral; parmi les divers ARN viraux, elle reconnait mieux l'ARN homologue; elle accepte cependant comme modèle des ARN étrangers, la spécificité n'est pas absolue.

- Synthèse de la Proteine virale.

Une fois l'ARN viral synthétisé, le développement du processus infectieux devient automatique parce qu'il entre dans les mécanismes normaux de la cellule; il suffit de suivre le schéma, aujourd'hui classique, de la synthèse proteique : l'ADN cellulaire est l'informateur permanent, les histones bloquent l'information inutile à chaque instant donné de la vie de la cellule; sur la partie libre d'ADN - ARN polymerase transcrit en un ARN messager l'information utile, le message s'étale sur les ribosomes cytoplasmiques, les ARN de transfert ou ARN solubles amènent sur place les acides aminés dans l'ordre correspondant à la séquence des bases du message, les liens peptidiques se forment, le polypeptide est synthétisé; le message ne sert que pour un nombre restreint de synthèses, il est bientôt détruit et remplacé par un autre ARN.

.../...

La fixation de l'ARN viral sur les ribosomes ou les polyribosomes a été observée pour de nombreux virus y compris la Mosaïque du Tabac (Van KAMMEN et la Mosaïque jaune du Navet (OFENGAND et HASELKORN); par ailleurs le rôle messager de l'ARN viral, a permis simultanément la démonstration de l'universalité du code génétique. In vitro les ribosomes d'Echerichia coli informés par l'ARN viral ont synthétisé pour une part des proteines similaires à celles de la proteine virale.

L'ARN viral porte donc au long de ses 6500 nucléotides, l'information pour la synthèse de sa réplicase et l'information pour la synhtèse de son manteau proteique.

Le processus infectieux est-il totalement expliqué par ces deux mécanismes ?

La replication virale ne se traduit pas en fait par un effet compétitif des ARN viraux sur les ARN normaux, mais par une anesthésie générale de la cellule qui laisse littéralement la place libre à la biosynthèse du virus.

Pour le Mengovirus par exemple la synthèse des ARN normaux et donc des proteines est complètement stoppée avant même l'apparition des ARN viraux. La Puromycine apportée au moment de l'infection rétablit la synthèse des ARN normaux. L'effet de la Puromycine en tant que bloqueur au niveau ribosomal des synthèses proteiques suggère que c'est aussi par l'intermédiaire d'une proteine qu'a lieu l'inhibition de l'activité normale. On découvre ainsi une troisième information portée par le génome du virus, celle d'une proteine jouant un rôle répressif sur la synthèse de l'ARN normal.

Ces trois génes : proteine réplicase, proteine manteau, proteine répressive, permettent de prédire l'existence de virus incomplets génétiquement manquants de l'une ou de l'autre de ces informations.

On trouve en effet pour le Rattle du Tabac (CADMAN C.H., 1962); pour la Nécrose du Tabac (KASSANIS B, WELKIE, 1963); pour la Mosaïque du Tabac SIEGEL A. et coll. 1962), des souches défectives qui ne produisent pas de proteine de protection, l'acide nucléique seul envahit la cellule. On peut imaginer même que certains virus n'existent que sous cette forme.

On trouve aussi des souches faibles, ou souches latentes d'un virus qui ne sont peut être que des virus dépourvus du gène répressif et qui se comportent donc comme des acides nucleiques compétitifs. Bien entendu on ne peut trouver d'infection virale sans replicase, car c'est l'essence même du virus et en dernier ressort on peut dire que le virus à ARN, est une séquence de nucléotides telle qu'elle porte l'information de la synthèse d'une proteine enzymatique qui sert à sa propre replication.

.../...

BIBLIOGRAPHIE

ASTIER S., CORNUET P. - C.R. Acad. Sci. (1964). (sous-presse)

BALTIMORE D., EGGERS H.J., FRANKLIN R.M., TAMM I. - Proc. N.A.S. 49, 843-849 (1963).

BELLETT A.J.P., BURNESS A.T.H. - Biochem. J. 77 17 p. (1960).

BROWN F., CARTWRICHT B., STEWART D.L. - Biochim. Biophys. Acta 47. 172 (1961)

CADMAN C.H. - Nature 193, 49 (1962).

CLINE M.J., EASON R., SMELLIE R.M.S. - Jour. Biol. Chem. 238, 1788-1792 (1963)

COCHRAN G.W. WELKIE G.W. et coll. - Nature 193, 544-548 (1962).

COCHRAN G.W., DHALIWAL A.S. et coll. - Science 138, 46-48 (1962).

CORNUET P., ASTIER S. - C.R. Acad. Sci. 255, 1660-1662 (1962).

CORNUET P., ASTIER S. - C.R. Acad. Sci. 255, 3076-3078 (1962).

CORNUET P., SPIRE D. - C.R. Acad. Sci. 250, 1843-1844 (1960).

DARNELL J.E., LEVINTOWL et coll. - Virology 13, 271 (1961).

FRANKLIN R.M., ROSNET J. - Bio. Chem. Biophys. Acta 55, 240-241 (1962).

HARUNA I. et coll. - Proc. N.A.S. 50, 905-911 (1963).

HOLLAND J.J., Mc.LAREN L.C. - J. exp. Med. 109, 487 (1959).

HOYLE L., FINTER N.B. - J. Hyg. Camb. 55, 290 (1957).

KARASEK W., SCHRAMM G. - Bioch. Bioph. Res. Comm. 9, 63-68, (1962).

KASSANIS B., WELKIE G.W. - Virology 21, 540-550 (1963).

OFENGAND J., HASELKORN R. - Bioch. Bioph. Res. Comm. 6, 469-474 (1962).

SANGER H.L., KNIGHT C.A. - Bioch. Bioph. Res. Comm. 13, 455-461 (1963).

.../...

SIMON E.H. - Virology 13, 105 (1961.

Van KAMMEN A. - Biochim. Biophys. Acta 53, 230-232 (1961).

WECKER E., HUMBER K., GOETZ O. - Virology 17, 110 (1962).

YOUNG TAI KIM, WILDMAN S.G. - Bioch. Bioph. Res. Comm. 8,294.

ZALTA J.P. et coll. - C.R. Acad. Sci. 256, 2471-2474 (1963).

ZECH H. - Z. Naturforsch. 166 520-538 (1961).

SERVICE DE VIROLOGIE

STATION CENTRALE DE PATHOLOGIE VEGETALE

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Route de St-Cyr - VERSAILLES (France).

Les planches photographiques ont été tirées par BRUNISSEN phototypeur - 30, rue Lebrun - PARIS (13°)

Etudes de Virologie appliquée n° 5 - Mars 1964.